

**Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin  
Sektion Nephrologie  
Leiter: Prof. Dr. med. S. Mitzner**

Titel der Arbeit:

**Entwicklung eines diagnostischen Parameters zur Bestimmung der Belastung des  
Patientenplasmas mit phagozytosepflichtigem Material**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Medizin**

der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von:

**Hartmut Duppel**

aus:

**Rostock**

Rostock, 2016

Dekan Prof. Emil Reisinger

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Chr.Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Steffen Mitzner, Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Priv. Doz. Dr. med. Martin Sauer, Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Lars Pape, Medizinische Hochschule Hannover

Datum der Einreichung: 14.12.2016

Rigorosum: 10.07.2018

Abbildungsverzeichnis	Seite
Abb. 1 Schematischer Ablauf einer Sepsis	1
Abb. 2 Pathogenese der Sepsis	9
Abb. 3 Aktivierung der Gerinnungskaskade in der Sepsis	12
Abb. 4 Schematischer Versuchsaufbau	15
Abb. 5 Versuchsgefäß in Form einer 96-Well-Platte	18
Abb. 6 Schematischer Versuchsaufbau mit ampholytarem Farbstoff	23
Abb. 7 Schematischer Versuchsaufbau mit ampholytarem Farbstoff ohne Antikörper	28
Abb. 8 Ascent- Fluorometer mit geöffneter Schublade für die 96-Well-Platte	28
Abb. 9 Messung der Extinktion in Abhängigkeit von der Menge der Ausgangszellmenge mit Phosphatidylserin als Zielstruktur	31
Abb. 10 Streulichteigenschaften der Zellbruchstücke im FACS	35
Abb. 11 Überprüfung der erwarteten Antikörperbindungen im FACS	36
Abb. 12 Veränderung der Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten in Abhängigkeit von der Partikelmenge	39
Abb. 13 Veränderungen der Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten in Abhängigkeit von der Partikelmenge pro ml und der Zentrifugationsgeschwindigkeit	40
Abb. 14 Veränderungen der Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten in Abhängigkeit von der Partikelmenge pro ml und der Zentrifugationsgeschwindigkeit, Vergleich zweier Zentrifugen	40
Abb. 15 Erstellung einer Standardreihe mit zerstörten HL-60-Zellen	41
Abb. 16 Erneute Erstellung einer Standardreihe mit zerstörten HL-60-Zellen	41
Abb. 17 Begrenzung der Zentrifugationsgeschwindigkeit auf 15000 G	42
Abb. 18 Erstellung einer Standardkurve mit HL60-Zellen in wässrigem Medium	43
Abb. 19 Standardkurve mit PKH2-GL-beschichteten Latexkugeln in wässrigem Medium	43

Abb. 20 Standardkurve mit PKH2-GL-beschichteten Latexkugeln in Plasma-ähnlichem Medium	44
Abb. 21 Messungen von Sepsisproben im Vergleich zu Gesunden	45
Abb. 22 Messungen von Sepsisproben	46
Abb. 23 Abhängigkeit der Extinktion von der Blockerkonzentration bzw. Blockzeit	85

<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
Tab. 1 Zellvitalität in Prozent der Ausgangszellmenge	33
Tab. 2 Vitalität in Abhängigkeit von der 30minütigen Exposition mit dem entsprechenden Detergenz	33
Tab. 3 Zellbruchstücke in Abhängigkeit von der Extinktion in relativen Einheiten	84
Tab. 4 Einfluss der Wahl des Blockers	84
Tab. 5 Überprüfung der unspezifischen Bindungen im ELISA	84
Tab. 6 Überprüfung unspezifischer Bindungen zwischen 1. und 2. AK und 2. und 3. AK	85
Tab. 7 Extinktion nach 30 Minuten in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration und der Menge der Zellbruchstücke	86
Tab. 8 Extinktionen des optimierten ELISA nach vorherigem Waschen der Zellen	86
Tab. 9 Extinktionen des optimierten ELISA - 1. Versuchsansatz	86
Tab. 10 Extinktionen des optimierten ELISA - 2. Versuchsansatz	87
Tab. 11 Extinktionen des optimierten ELISA - mit gewaschenen Zellen	87
Tab. 12 Vorversuch mit dem Farbstoff PKH2-GL	88
Tab. 13 Fluoreszenzfarbstoff bei reduzierter Zellzahl	88
Tab. 14 Weitere Messungen mit reduzierter Zellzahl	88
Tab. 15 Tween als neuer Blocker	88
Tab. 16 Testung der matten Mikrotiterplatte von Greiner	89
Tab. 17 Testung der glänzenden glatten Mikrotiterplatte von Greiner	89
Tab. 18 Erhöhung der G-Zahl beim Zentrifugieren	89
Tab. 19 Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Bruchstückmenge bzw. der Zerstörungszeit mit Ultraschall	89

Tab. 20 Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zellbruchstückmenge	90
Tab. 21 Weitere Messungen der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zellbruchstückmenge	90
Tab. 22 Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Bruchstückmenge und unterschiedlichen G-Zahlen bei der Zentrifugation	90
Tab. 23 Ermittlung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Bruchstückmenge und unterschiedlichen G-Zahlen bei der Zentrifugation	91
Tab. 24 Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Bruchstückmenge und unterschiedlichen G-Zahlen bei der Zentrifugation	91
Tab. 25 Weitere Ermittlungen der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Bruchstückmenge mit zwei verschiedenen Zentrifugationsgeschwindigkeiten	91
Tab. 26 Fluoreszenz der zerstörten HL-60 Zellen in Abhängigkeit von der Bruchstückmenge	92

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AK	Antikörper
APACHE	Acute Physiology And Chronic Health –Score, der allgemein die Schwere einer Erkrankung auf der Intensivstation einschätzt und in 3 Stufen einteilt
APC	Antigen-präsentierende Zellen
ATRA	all-trans Retinsäure, zur Differenzierung myeloider Vorläuferzellen in Richtung Granulozyten, Synonym Tretinoin
BSA	Rinderalbumin
CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome, antiinflammatorische Reaktion nach proinflammatorischer Reaktion
CD	cluster of differentiation, immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen
cf DNA	cell free DNA, entspricht den NETs
DAMPs	Damage-associated molecular patterns, körpereigene Stoffe, die eine Entzündungsreaktion auslösen, zum Beispiel HMGB1
DC	dendritische Zellen
d.h.	das heißt
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSG	Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V.
EGDT	early goal-directed therapy, Sepsis-Therapie bestehend aus intravenöser Flüssigkeitsgabe, Vasopressoren, inotropen Substanzen und Bluttransfusionen zur Kreislaufstabilisierung
EISS	extracorporeal immune support system
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, Enzym-Immunoassay
FACS	fluorescent absorbent cell sorter
FDA	Food and Drug Administration, Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten
HLA	humanes Leukozytenantigen

HLA-DR	Ein Teilabschnitt des Humanen Leukozytenantigens (HLA)
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1, ein Alarmin, ein Protein, das von abgestorbenen Zellen freigesetzt wird und als immunaktivierend vom Körper erkannt wird
ICAM	intracellular adhesion molecule, intrazelluläres Adhäsionsmolekül, ein Integrin, welches eine wichtige Funktion in der Signalübermittlung hat
IL	Interleukin, ein Zytokin, welches zu den Peptidhormonen gehört. Es ist jeweils mit einer Ziffer zur Unterscheidung versehen, beispielsweise IL-1.
ITS	Intensivstation
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Na/KATPase	Transportprotein in allen Zellwänden
NETs	neutrophil extracellular traps, DNA-Gerüste, welche Cytoplasmaproteine wie Histone, Elastase, Myeloperoxydase, Pentraxin, Lactoferrin und viele andere tragen, sie sind eine Teil des menschlichen Abwehrsystems
NK-Zellen	natürliche Killerzellen, produzieren zytotoxische Stoffe und Zytokine
NO	Stickstoffmonoxid, hat eine gefäßerweiternde Wirkung
PCT	Procalcitonin, eine Vorstufe des Calcitonins, wird zur Diagnostik und Prognoseabschätzung bei Sepsis verwendet
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphor buffered saline, eine Puffersubstanz
PIRO	Predisposition, Infection, Response, Organ dysfunction, ein Sepsis-Score
PKH2-GL	ein grüner Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von Zellmembranen
PS	Phosphatidylserin
qSOFA	quick SOFA, Schnelltest aus den 3 klinischen Angaben, Atemfrequenz über 22/Min, Herzfrequenz über 100/Min und Vigilanzstörung, die eine Wahrscheinlichkeit einer Sepsis vorhersagen sollen
SAPS-Score	Simplified Acute Physiology Score, soll den physiologischen Gesamtzustand eines Patienten einschätzen
SeptNet	Kompetenznetz zur Erhebung nationaler Daten zur Sepsisepidemiologie
SIRS	systemic inflammatory response syndrome, häufig Vorstufe einer Sepsis

SOFA	sequential (sepsis-related) organ failure assessment, ein Sepsis-Score der Aussagen zur Prognose des Patienten macht, in abgewandelter Form auch als qSOFA
sog.	sogenannter/sogenannte
SPSS	ein Statistikprogramm
SD	Standardabweichung
SSC	Surviving Sepsis Campaign, hat Maßnahmenbündel zur Sepsistherapie 2004 publiziert und 2008 und 2013 aktualisiert
sTRAIL	lösliche Form des TRAIL
TLR	Toll-like Receptor, Rezeptor des angeborenen Immunsystems
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha, ein proinflammatorisches Zytokin der frühen Sepsis
TRAIL	Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
VCAM	vascular cell adhesion molecule, ein Integrin, welches für die Informationsübermittlung der Zellen zuständig ist
ZNS	Zentrales Nervensystem



## **Inhaltsverzeichnis**

## **Seite**

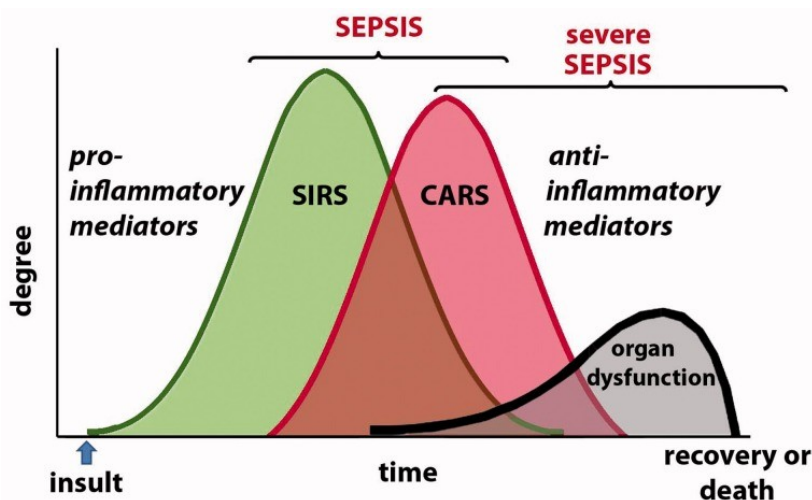
1. Einleitung .....	1
2. Material und Methoden .....	14
3. Ergebnisse .....	30
4. Diskussion .....	46
5. Zusammenfassung und Ausblick .....	61
6. Literaturverzeichnis:.....	62
7. Anhang .....	77

# 1. Einleitung

## 1.1 Sepsis und Epidemiologie

Trotz einer stetigen Zunahme der Möglichkeiten an Antibiotikatherapien in den letzten Jahren sind die Sepsisinidenz und -letalität nach wie vor sehr hoch (25). In Deutschland wird eine Sepsisletalität von 55-70% bei Patienten in Krankenhäusern beobachtet (38,88). Ähnliche Beobachtungen können auch in Japan und den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) gemacht werden (105,111). In den USA ist die Sepsis mit jährlichen Gesamtkrankenhauskosten von 22,2 Milliarden US-Dollar eines der kostenintensivsten Krankheitsbilder (36). Hierbei sind Folgekosten für Anschluss-Heil-Behandlungen und Arbeitsausfall, sowie Kosten für die Wiedereingliederung in den Arbeitsprozess noch nicht mit einberechnet. In Deutschland fehlen trotz der Gründung des Kompetenznetzwerkes SEPTNET im Jahre 2003 verlässliche Zahlen zur Sepsisinidenz. Bisherige Erhebungen waren auf Intensivstationen und Patienten mit schwerer Sepsis beschränkt (36).

Die vergleichsweise unspezifische Definition des Begriffes Sepsis stellt eine Herausforderung für die Strategie der Sepsistherapie dar. Nach der Deutschen Sepsis-Gesellschaft (DSG) besteht die Sepsis aus einer komplexen systemischen inflammatorischen Wirtsreaktion auf eine Infektion (88). Desweiteren scheint neben der proinflammatorischen Reaktion auch die antiinflammatorische an Bedeutung zu gewinnen. Diese wird als CARS (compensatory anti-inflammatory response syndrome) bezeichnet (Abbildung 1) (34). Ein Überwiegen einer antiinflammatorischen Reaktion führt zur Immunparalyse (41).



**Abb. 1: Schematischer Ablauf einer Sepsis (34)**

Neben der erwähnten systemischen Inflammation kann aber auch noch eine Immunparalyse beobachtet werden, welcher zunehmend mehr Bedeutung beigemessen wird, obwohl diese fast asymptomatisch verläuft (6). Darüber hinaus wird dem völligem Ausfall oder der starken Verminderung der Phagozytosefähigkeit immer mehr Beachtung geschenkt (105), um hier eventuell einen neuen Therapieansatz zu finden.

Die Diagnose Sepsis wird klinisch gestellt:

**SIRS-Kriterien:**

- **Fieber ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) oder Hypothermie ( $\leq 36^{\circ}\text{C}$ )**
- **Tachykardie: Herzfrequenz  $\geq 90/\text{min}$**
- **Tachypnoe (Frequenz  $\geq 20/\text{min}$ ) od. Hyperventilation ( $\text{PaCO}_2 \leq 4,3 \text{ kPa}$ )**
- **Leukozytose ( $\geq 12\,000/\text{mm}^3$ ) od. Leukopenie ( $\leq 4\,000/\text{mm}^3$ )**
- **klinischer oder mikrobiologischer Keimnachweis im Blut**

Fehlte der klinische oder mikrobiologische Keimnachweis, sprach man von einem **SIRS** (systemic inflammatory response syndrome), mit Keimnachweis von einer Sepsis. Man sprach von einer **schweren Sepsis**, wenn zu den o.g. Sepsiskriterien noch Zeichen der Organdysfunktion, Hypoperfusion oder septisch induzierte Hypotension hinzutraten.

Im Jahre 2016 wurden in Orlando auf dem Jahreskongress der Society of Critical Care Medicine die neuen Kriterien der Sepsis vorgestellt und im amerikanischen Ärzteblatt publiziert (100). Die Revision des Sepsis-Begriffes wird als SEPSIS-3 bezeichnet. Es wurden zwei Studien zur Entwicklung der neuen Definition und eine zur Validierung durchgeführt. Im Vordergrund steht nun nicht mehr die Inflammation, sondern die Klinik, die mit dem SOFA-Score (siehe unten) das Organversagen in den Mittelpunkt setzt. Heute wird unter der Sepsis eine lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer fehlregulierten Körperantwort auf eine Infektion verstanden. Auf die SIRS-Kriterien wird verzichtet, da sie zu unspezifisch sind und einen zu geringen klinischen Nutzen haben. Zwischen schwerer Sepsis und Septischem Schock wird heute nicht mehr unterschieden. Eine Sepsis liegt vor, wenn der SOFA-Score akut um 2 oder mehr Punkte steigt, was mit einem Sterberisiko von etwa 10% verbunden ist. Als septischer Schock wird heute ein Zustand mit deutlich erhöhter Sterblichkeit durch Veränderungen in der Kreislaufreaktion und auf metabolischer und zellulärer Ebene verstanden

(99). Klinische Kriterien sind hier der Einsatz von Vasopressoren, um einen mittleren arteriellen Druck von 65 mmHg zu erreichen und ein Laktatanstieg auf über 2 mmol/l, trotz ausreichender Flüssigkeitszufuhr. Das Team von Christopher Seymour überprüfte die Validität der neuen Sepsisdefinition anhand von 1,3 Millionen elektronischen Patientenakten, bewerteten diese nach gängigen und neuen klinischen Kriterien und verglich sie mit dem tatsächlichen Krankheitsverlauf (98).

Trotz der hohen Sepsis-Letalität und den ökonomischen Belastungen ist diese in der Öffentlichkeit, im Gegensatz zu anderen lebensbedrohlichen Erkrankungen, wie zum Beispiel dem Myokardinfarkt, nahezu unbekannt. In einer Umfrage gaben 47% der Befragten an, den Begriff "Sepsis" noch nie gehört zu haben (69). Schon 2008 veröffentlichte Ibrahim einen Artikel mit dem Titel "It is time to label sepsis as a public health problem"(43). Die Sepsis als öffentliches Gesundheitsproblem zu betrachten ist hochaktuell.

Anders als beim ST-Hebungsinfarkt oder einem ischämischen Schlaganfall gibt es bei der Sepsis jedoch noch keine Sensibilisierung für das präklinische Vorgehen oder die Voraussetzungen des aufnehmenden Krankenhauses (95).

Es gibt mehrere Scoring-Systeme, mit denen man versucht hat, die Schwere einer Erkrankung zu klassifizieren und die Überlebenswahrscheinlichkeit zu berechnen. Nicht alle diese Scoring-Systeme haben sich im klinischen Alltag bewährt und werden nur der Vollständigkeit halber erwähnt:

**APACHE-Score** (Acute Physiology And Chronic Health–Score) ist ein 1978 entwickeltes Verfahren, welches die Prognose einer Erkrankung einschätzen soll. Aufgrund seiner Komplexität wurde in der medizinischen Routine auf den Einsatz verzichtet. Im Jahr 1985 wurde der APACHE II-Score entwickelt sowie 1991 der APACHE III-Score, der computerunterstützt die Überlebenswahrscheinlichkeit ermittelt. In diesem Score werden neben dem Alter des Patienten aktuelle Befunde und anamnestiche Angaben berücksichtigt. Heute wird der APACHE II-Score als "Goldstandard" betrachtet und ist am weitesten verbreitet (48).

**SAPS II-Score** (Simplified Acute Physiology Score) wurde entwickelt, um in klinischen Studien eine Maßzahl für den physiologischen Zustand eines Patienten zu bekommen. Der SAPS II-Score ermöglicht die Einschätzung der Erkrankungsschwere von Intensivpatienten sowie die Berechnung des Letalitätsrisikos. Neben dem Alter fließen Vitalwerte und Laborwerte in den Score ein.

**SOFA** (sequential (sepsis-related) organ failure assessment) ist ein Sepsis-Score, der Aussagen zur Prognose des Patienten macht. SOFA wurde 1996 durch eine Konsensuskonferenz entwickelt und soll die Organdysfunktion oder das Organversagen beschreiben. Hierbei werden 6 Organsysteme beurteilt und jeweils mit 1 bis 4 Punkten bewertet. Der initiale Score korreliert sehr gut mit der Prognose der Patienten. Im Gegensatz zum SAPS II und APACHE II-Score wurde der SOFA zur Beurteilung der Organdysfunktion und Morbidität mit geringerer Hervorhebung der Mortalitätsvorhersage entwickelt. Es fließen die Parameter Respiration, Gerinnung, Leberfunktion, Herzkreislauffunktion, ZNS- und Nierenfunktion ein (35). Eine Variante des SOFA-Scores ist der qSOFA als Schnelltest (2), der seit 2016 zur Risikoeinschätzung verwendet werden soll. Mit ihm werden durch eine Atemfrequenz über 22/Min, einem systolischen Blutdruck von 100 mmHg oder weniger und einer veränderten Vigilanz das Risiko für eine Sepsis eingeschätzt.

Das **PIRO** - Staging-Konzept wurde erarbeitet aus den Kriterien "Prädisposition, Infektion, Response (Immunantwort) und Organdysfunktion". Das PIRO-Staging-Konzept ist eine Stratifizierung und Prognosevorhersage, die dem APACHE-II-Score signifikant überlegen sein soll (31,121).

**Internistische Sepsis-Scores**, wie der von Schumacher 1998 beschriebene (97), konnte sich in der Praxis nicht durchsetzen. Hierfür wurden 7 Kriterien (Atemfrequenz, Herzfrequenz, Körpertemperatur, C-reaktive Protein, Laktat, Leukozyten und Thrombozyten) ermittelt und mit ein bis drei Punkten bewertet werden. Ziel sollte es sein, nicht nur septische Patienten zu identifizieren, sondern auch die Schwere der Krankheit beurteilen zu können.

### **Bisherige Therapieansätze**

In der Vergangenheit hat man durch Erforschung der in Kapitel 1.2 beschriebenen Pathomechanismen versucht, stetig neue Therapieansatzpunkte zu finden, um die hohe Letalität zu reduzieren: Die bestehenden Therapien werden eingeteilt in kausale Therapien, wie Fokussanierung, und supportive Therapien, wie hämodynamische und metabolische Stabilisierung. Des Weiteren werden zusätzlich zur kausalen oder supportiven Therapie gegebene Maßnahmen als adjunktive Therapien bezeichnet, welche das Überleben der Patienten verbessern sollen (16). Die kausalen Therapiemöglichkeiten bleiben im operativen Bereich uneingeschränkt wichtig und stellen neben der sich ständig erweiterten antimikrobiellen Therapie und den supportiven Maßnahmen den wichtigsten Grundpfeiler der

Behandlung dar. Allerdings scheint ein alleiniger frühzeitiger Beginn einer antibiotischen Therapie nicht nur Vorteile aufzuzeigen, sondern kann auch Schäden und damit schlechteres Überleben hervorrufen (18). In der MEDUSA-Studie (MEDUSA = Medical Education for Sepsis Source Control an Antibiotics) konnte gezeigt werden, dass eine frühzeitige operative Fokussanierung einen Überlebensvorteil bietet (12,96).

Eine alleinige frühzeitige Kreislaufstabilisierung und -überwachung, nach EGDT-Protokoll (early goal-directed therapy) konnte in einer randomisierten dreiarmligen kontrollierten Studie kein verbessertes Überleben erzielen (19,22,115). Auch eine frühe Wiederherstellung der Mikrozirkulation durch Nitroglycerin, Enoximon, Dopamin und Kortikosteroide konnte zu keiner Reduktion der gefürchteten Multi-Organ-Versagen führen (109). Zudem konnte in der ALBIOS-Studie die Gabe von Albumin kein verbessertes Überleben im Vergleich zu kristalloiden Salzlösungen zeigen (20,40).

Der größte Teil an Neuerungen und Veränderungen zeigt sich im Bereich der adjunktiven Therapien, welche hier näher betrachtet werden sollen. Es werden folgende Grundprinzipien unterschieden:

### **Antagonisierung von proinflammatorischen Mediatoren**

Bei der Antagonisierung von proinflammatorischen Mediatoren wurden vor allem Zytokine und Chemokine wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) und seine verschiedenen Rezeptoren, Interleukine (IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-18) und High-Mobility-Group-Protein B1 (HMGB1) als Angriffspunkte gewählt. In der RAMSES-Studie wurde ein TNF- $\alpha$ -Antikörperfragment (Afelimomab) und in der MONARCS-Studie ein Anti-TNF-Antikörper ohne signifikanten Vorteil bei septischen Patienten eingesetzt (60). Eine Metaanalyse aus dem Jahre 2014 stellt diese Beurteilung in Frage (58). Neben verschiedenen monoklonalen Antikörpern zur „Neutralisierung“ der inflammatorischen Mediatoren wurden auch mehrere mechanische Verfahren zur Entfernung von den vielfältigen Zytokinen, Lipopolisacchariden und C5a experimentell erprobt (61). Der vielversprechende anti-Toll-like-rezeptor (TLR) -4 Antikörper konnte keine Verbesserung der Mortalität in der schweren Sepsis erzielen (4). In der ACCESS-Studie wurde dies randomisiert belegt (77). Hingegen konnte ein Polymorphismus des Toll-like-Rezeptors 1 als prädisponierend für schwere Organdysfunktionen und Tod bei Sepsis gezeigt werden (117). Auch die Gabe von humanem rekombinanten Laktoferrin (Talaktoferrin) wird mit Skepsis bezüglich der Verbesserung eines Überlebens betrachtet.

Hierzu liefert eine randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Phase 2-Studie aus dem Jahr 2013 hoffnungsvolle Ergebnisse (39,63).

### **Antagonisierung von gerinnungsfördernden Mediatoren**

Im Tierversuch hatte die Neutralisierung von aktiviertem Gewebefaktor, aktivierten Gerinnungsfaktoren V und VIII einen Ansatzpunkt gezeigt, der sich im klinischen Alltag als ineffektiv erwies (61). In der OPTIMIST-Studie wurde der Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) ebenfalls ohne einen signifikanten Vorteil eingesetzt (7). Aktiviertes Protein C (Drotrecogin  $\alpha$ , Xigris<sup>®</sup>), eine antithrombotische Serin-Protease, schien bei Patienten mit einem schweren septischen Schock, einem Mehrorganversagen bzw. einem Apache II-Score von  $> 25$  Vorteile zu ergeben (8). Dies wurde in der PROWESS und ENHANCE-Studie untersucht, wird aber nicht generell bei jeder Sepsis empfohlen, da die Blutungskomplikationen in einem ungünstigen Verhältnis zum zu erwartenden Vorteil stehen (88). Drotrecogin  $\alpha$  wurde durch die Herstellerfirma Lilly in Übereinstimmung mit der FDA vom Markt genommen (30,111). In der Kybersept-Studie konnte kein signifikanter Vorteil für die Gabe von Antithrombin III bei septischen Patienten nachgewiesen werden (113).

### **Korrektur der endokrinologischen Dysregulationen**

Im septischen Schock weist jeder zweite Patient eine relative adrenale Insuffizienz auf (102). In der europäischen CORTICUS-Studie mit 499 Patienten zeigte sich zwar eine erhöhte Letalität bei adrenaler Insuffizienz, aber unter der Substitution mit Kortikosteroiden zeigte sich eine erhöhte Rate von Superinfektionen (16). Aus diesem Grund wird keine generelle Empfehlung zur Kortikosteroidtherapie bei Sepsis oder Septischem Schock gegeben (5,66). Ebenso ernüchternd fielen die Daten bei der Normalisierung der Blutzuckerspiegel mittels intensivierter Insulintherapie aus. Nach einer großen multizentrischen Studie aus dem Jahre 2008 wird dies nicht mehr empfohlen, da keine Prognoseverbesserung bei Sepsis bzw. schwerer Sepsis gezeigt werden konnte und die Anzahl der schweren Hypoglykämien deutlich zunahm (15).

### **Immunmodulation**

Auch die Gabe von Immunglobulinen kann nach einer Metaanalyse nicht mehr empfohlen werden (50). Ebenfalls zeigte die SBITS-Studie mit 624 Patienten keine Verbesserung der Überlebensrate (114). Statine zeigten in einer prospektiven, randomisiert-kontrollierten Studie

(23) keine Vorteile, dies konnte auch in einer Metaanalyse aus dem Jahre 2010 bestätigt werden (10).

Insgesamt kann festgestellt werden, dass es trotz der vielen initial erfolgversprechenden Substanzen und Therapieansätze noch keine erfolgreiche Therapie gibt (62). Auch kann man von keiner wesentlichen Reduktion der Sepsis-Sterblichkeit sprechen. Ein wesentliches Problem scheint auch darin zu liegen, dass die an Tiermodellen mit Maus und Ratte erhobenen Erkenntnisse sich nicht auf den Menschen übertragen ließen, da die Immunsysteme deutliche Unterschiede aufweisen (30).

Man konzentrierte sich darauf, bestimmte Risikokonstellationen wie zelluläre und humorale Immunkompetenz, Splenektomie und schwere chronische Erkrankungen mit Organinsuffizienz oder genetische Varianzen, die zu schweren septischen Verlaufsformen prädisponieren, zu identifizieren und dann gezielt zu therapieren (57). Den genetischen Polymorphismen bei der Codierung von Zytokinen, Zelloberflächenrezeptoren, Angiotensin-converting-enzyme, Plasminogenaktivator-Inhibitor und anderen wird bei der Risikoeinschätzung mehr Bedeutung geschenkt (56).

Es sind auch verschiedene extrakorporale und bioartifizielle Therapieverfahren zur selektiven und unselektiven Entfernung von endogenen und exogenen pathologischen Partikeln und Entzündungsmediatoren in Erprobung. Hier liegt ein besonderes Interesse der Rostocker Arbeitsgruppe, welches mit dem EISS (extracorporeal immune support system), im Schweine-Modell für schwere Verlaufsformen der Sepsis einen Überlebensvorteil zeigen konnte (92-94).

## **1.2 Pathomechanismen der Sepsis**

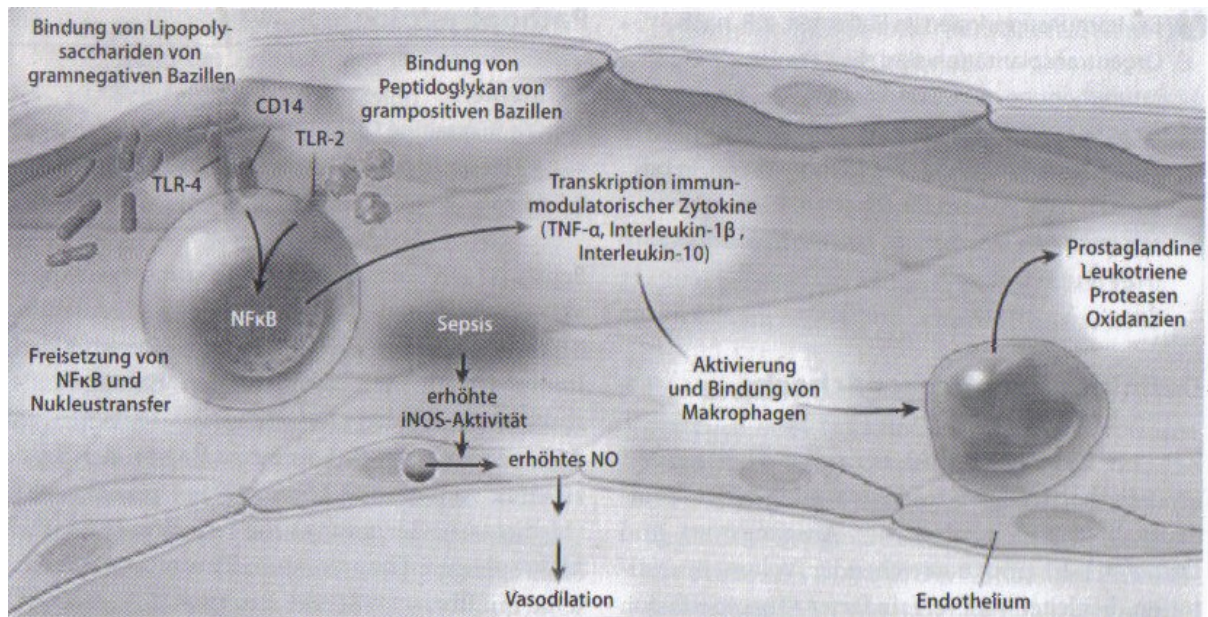
Da die verschiedenen bekannten Pathomechanismen der Sepsis Angriffspunkte für einen möglichen Therapieansatz bieten, ist es wichtig, sich diese vor Augen zu führen. Derzeit sind jedoch noch immer nicht alle Pathomechanismen bekannt.

Als gesichert gilt heute: Nach einer Bindung von grampositiven (Proteoglykane) und gramnegativen (Lipopolysaccharide) Bakterienbestandteilen an den sog. Toll-like-Rezeptor (TLR-2 und -4) kommt es zur Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  und -6 sowie antiinflammatorischen



Zytokinen wie z.B. Interleukin 4 und -10 (22,34,80), (siehe Abb. 2). Die PAMPs, pathogen-associated molecular patterns, sind zum Beispiel bestimmte Anordnungen von Zuckermolekülen oder Lipopolysacchariden auf der Oberfläche von Bakterien, welche durch Bindung an Rezeptoren als Mikroorganismen von dem angeborenen Immunsystem erkannt und bekämpft werden. Ähnliche Reaktionen können auch durch Traumata ausgelöst werden: Hier werden die körpereigenen Biomoleküle, die nichtinfektiöse Entzündungsreaktion auslösen, als DAMPs, damage-associated molecular patterns, oder Alarmine bezeichnet (9). Hierzu zählt zum Beispiel HMGB1, welches beim Zellzerfall freigesetzt wird. Die daraufhin freigesetzten proinflammatorischen Zytokine aktivieren das Endothel und die neutrophilen Granulozyten, welche wiederum die Adhäsionsmoleküle hochregulieren. Hierzu gehören die leukozytären Integrine CD 11/CD 18 und endotheliale Adhäsionsmoleküle wie z.B. E-, P-Selektine sowie Intrazelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM-1 und -2) auf der Endothelzelle und L-Selektine auf Granulozyten, sowie die vaskulären Zelladhäsionsmoleküle (VCAM-1) auf Lymphozyten. Hierauf kommt es zu einer verstärkten Interaktion zwischen den Endothel- und Abwehrzellen mit Störung der endothelialen Integrität und Funktion. Es entsteht ein interstitielles, proteinreiches Ödem mit verstärkter Stickstoffmonoxid (NO)-Freisetzung und konsekutiver Vasodilatation. Die Aktivierung der NO-Synthetase wiederum erfolgt durch die Zytokine IL-1 und IL-6, Endotoxin und TNF- $\alpha$  (78).

Gleichzeitig kommt es neben den eben beschriebenen Veränderungen des Immunsystems durch die Lipopolysaccharid-Stimulation der Endothelzellen zu einer vermehrten Bildung des sog. „tissue factors“, welcher die Gerinnung anstößt. Hierdurch kommt es zur Störung der Mikro- und Makrozirkulation mit der Ausbildung von Mikrothromben und der Gefahr des Multiorganversagens sowie Hypovolämie aufgrund des erniedrigten systemvaskulären Widerstandes und des „capillary-leak-syndromes“ (28,42). Zusätzlich beobachtet man in der Sepsis einen reduzierten Protein-C-Spiegel, welcher eine Störung der Fibrinolyse, sowie eine Thrombenbildung aufgrund einer fehlenden Thrombin-Thrombomodulin-Stimulation verursacht (38).



**Abb. 2: Pathogenese der Sepsis (38). Beteiligung verschiedener Mediatoren und deren Wirkung auf den Organismus**

### Immunparalyse:

Es wird heute als bewiesen angesehen, dass die B- und T-Zellen durch Apoptose in der Frühphase der Sepsis zugrunde gehen (13,103). Dies führt zu einer schwerwiegenden Immunsuppression (13). Des Weiteren konnten in lipopolysaccharid-stimulierten Zellen von septischen Patienten *in vitro* deutlich geringere Produktionen von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 und IL-10 nachgewiesen werden, als bei einer identischen Gruppe gesunder Probanden (13). Die bei septischen Patienten meist schon bei der Einlieferung auf eine Intensivstation vorliegende Lymphopenie ist ein Frühzeichen der Sepsis mit bereits bestehender Immunparalyse (104,111). Jeder gesunde Körper hat eine ausreichende Anzahl an Phagozyten, die die unten beschriebenen Mikropartikel phagozytieren. Dies geschieht nach einer Aktivierung der Makrophagen über verschiedene Aktivierungskaskaden (53). Bei bestimmten Krankheitsentitäten, insbesondere der Sepsis, kommt es jedoch zum Ausfall oder einer Überlastung des phagozytierenden Systems – dazu trägt auch die Immunparalyse bei. Selbst wenn die Immunparalyse fast keine klinischen Symptome zeigt, kann sie im Falle der Sepsis schon im frühesten Stadium mit einer Reihe von Labortests diagnostiziert werden. Dies könnte therapeutische Schritte ermöglichen, die die Überlebenschancen erhöhen würden (6,42,90). Einen Parameter zur Messung der "Immunkompetenz" stellt die monozytäre HLA-DR-Expression dar, welche mittels Durchflusszytometrie gemessen werden kann (110). Bei einer Sepsis kommt es zum Abfall der HLA-DR-Expression (70).

Die Immunparalyse ist ein unterdiagnostiziertes und damit auch untertherapiertes Problem der Sepsis und bedarf mehr Aufmerksamkeit und Forschungsaktivität.

### **Mikropartikel:**

Jede Zelle eines Lebewesens unterliegt in unterschiedlich langen Abständen einer kompletten oder teilweisen Erneuerung (Stoffwechsel). Auch findet Apoptose, also programmierter Zelltod, statt, welche physiologischen oder pathologischen Ursprungs sein kann (118). Gehen Zellen zugrunde bleiben Bruchstücke übrig, welche dann im Blut zirkulieren und konzentrationsabhängig dessen Eigenschaften beeinflussen. Es können sich aber auch Vesikel von den Oberflächen apoptotischer oder stress-aktivierter Zellen abschnüren (119). Auch im Plasma gesunder Personen gibt es Bruchstücke in niedrigen Konzentrationen. Sie werden als Mikropartikel bezeichnet. Unter physiologischen und pathologischen Bedingungen kommt es zum Anstieg dieser Mikropartikel in unterschiedlichem Ausmaß. Beobachtet wurden die Bruchstücke in Blutaussstrichen schon länger, allerdings ist man erst in letzter Zeit dazu übergegangen, ihnen Beachtung zu schenken (26,67,87).

Die Mikropartikel haben eine Größe von 0,1 bis 10 µm (26,53,67,82,119) und treten bei verschiedenen pathologischen Ursachen auf: Thrombozytenaktivierung, direktem Gefäßendothelschaden, Thrombinaktivität auf der Zelloberfläche (75), C5b-9-Aktivierung und PF4-Heparin-Antikörper-Interaktion (55,81). Für einzelne Krankheitsbilder gibt es schon länger Nachweise erhöhter Zellbruchstücke: Sepsis (26,73,120), besonders Meningokokkensepsis (74), Leukämien, ischämische Hirninfarkte (52), heparininduzierte Thrombozytopenie (HIT), aplastische Anämie, paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH), Schwangerschaft und Prä-Eklampsie (86) Sichelzell-Erkrankung (SCD), Herzinfarkt und Urämie bei chronisch dialysepflichtigen Patienten (76,116). Mit zunehmendem Lebensalter scheint sich die Anzahl und Auswirkung der Mikropartikel im menschlichen Organismus zu ändern (37).

Den Mikropartikeln werden proinflammatorische und prokoagulatorische Eigenschaften nachgesagt, außerdem sollen sie den Gefäßtonus beeinflussen (67,71,72,112). Neuerdings beschreibt man sogar eine wichtige Rolle der Mikropartikel in der inter- und intrazellulären Kommunikation, wobei Zellrezeptoren, Zellorganellen, mRNA oder andere Proteine zu Zielzellen übertragen werden (51,53,67,82,101,107).

Die oft nur als Zellbruchstücke angesehenen Mikropartikel haben damit eine Schlüsselrolle in der Neuprogrammierung der Zellen und der Gewebe durch Steuerung der Angiogenese,

komplexen Immun-Antworten und Apoptose (53,82). Damit haben die Mikropartikel nicht nur zerstörerische, sondern auch protektive Effekte auf den Organismus (51).

Die uneinheitliche Nomenklatur hat die Verständigung zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen erschwert: So unterscheiden Burger et al. und Souza et al. unter Berufung auf Cantaluppi et al. (21) zwischen den kleinen Exosomen, den Mikrovesikeln (60-160 nm) und den größeren Mikropartikeln (200-2000 nm) (17). Auf eine einheitliche Nomenklatur hat man sich aber noch nicht endgültig einigen können.

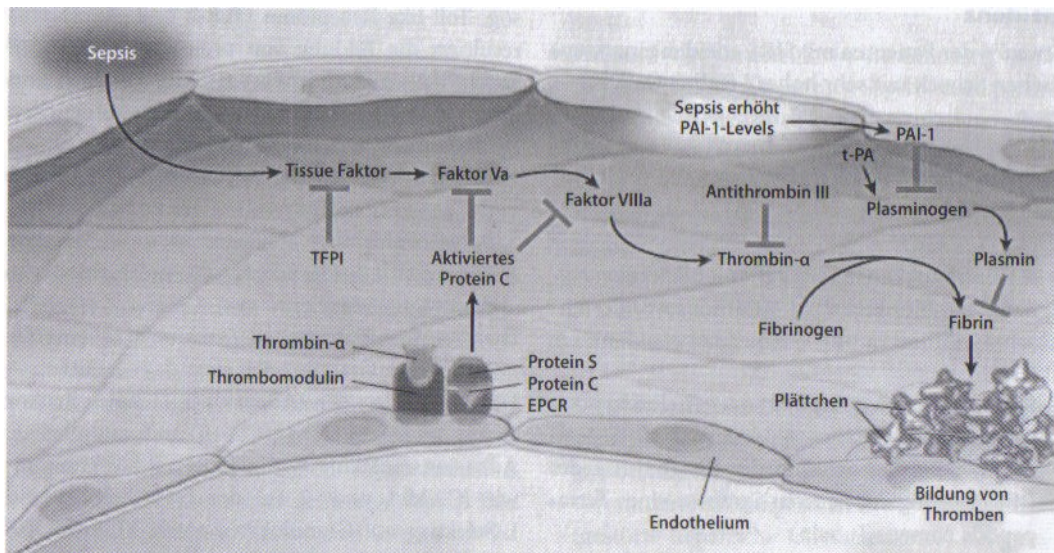
Auch die NETs (neutrophil extracellular traps), DNA-Netze oder cf-DNA (cell free DNA) scheinen in der Pathogenese septischer Krankheiten einen wichtigen Stellenwert einzunehmen. Es wird angenommen, dass die NETs Kapillaren okkludieren und so die Mikro-zirkulation stören können (59,65).

Entsprechend der Heterogenität des Ursprungs der Mikropartikel gibt es viele verschiedene Detektionsmöglichkeiten für diese. Die beiden wichtigsten sind die Durchflusszytometrie und der ELISA (74,120).

Die genaue Auswirkung der sogenannten Mikropartikel auf den menschlichen Organismus ist noch nicht vollständig erforscht. Allerdings ist bekannt, dass es bei den oben genannten Erkrankungen gehäuft zu Aktivierungen von Gerinnungskaskaden und Auftreten von Thrombosen kommt (74). Eine Sequenz von Mikropartikeln zur Inflammation wird immer wieder beobachtet (26) und gilt heute als gesichert.

### **Aktivierung der Gerinnungskaskade**

Als Reaktion des Körpers auf eine Infektion folgt die Aktivierung der Gerinnung, um die Ausbreitung der Erreger einzudämmen (Abb.3), bzw. um die Erreger loszuwerden; allerdings kommt diese Reaktion bei einer Sepsis zu spät, da die Erreger bereits gestreut haben und es durch die Aktivierung der Gerinnungskaskaden zu diffusen Mikrothromben und Organversagen kommt (7).



**Abb. 3: Aktivierung der Gerinnungskaskade in der Sepsis (38)**

Die mit der Sepsis assoziierte Entzündungskaskade führt zur Gerinnungsaktivierung und Inhibition der Fibrinolyse. Hierdurch werden neben der Thrombinbildung Fibrinaggregate im Kapillarbett gebildet (disseminierte intravasale Gerinnung, DIC) und auch direkte und indirekte Mechanismen der systemischen Inflammation unterhalten (54). Das endogene Antikoagulans Antithrombin III (AT III) bremst prokoagulatorische und proinflammatorische Prozesse, fällt bei einer Sepsis dramatisch ab und korreliert mit dem Schweregrad der Sepsis (89). Eine exogene Substitution von AT III konnte in der Kybersept-Studie keine Senkung der Letalität nachweisen.

Auch Protein C, ein Proenzym, welches von Thrombin im Komplex mit Thrombomodulin zu aktiviertem Protein C umgewandelt wird, ist bei Sepsis stark vermindert. Aktiviertes Protein C inaktiviert mit Protein S Gerinnungsfaktoren und wirkt damit antithrombotisch. Das Protein C-Präparat Drotrecogin wurde wegen schwerer Blutungskomplikationen wieder vom Markt genommen (57).

### **Zellaktivierung:**

NK-Zellen haben die Fähigkeit, zytotoxische Substanzen abzusondern und Cytokine zu produzieren. Daher sind sie wichtig in der Abwehr von Pilzen, Bakterien und Viren in der Immunsuppression der fortgeschrittenen Sepsis. In der frühen Phase der Sepsis scheinen sie eher an einer überaktiven Immunstimulation beteiligt zu sein, welche dem Organismus auch Schaden zufügen kann (111).

### 1.3 Biomarker der Sepsis

Eine weitere Herausforderung stellt die Diagnostik der Sepsis dar: Es gibt derzeit keinen Parameter, der allein zur Diagnose der Sepsis führt (88). Bereits 178 Biomarker wurden laut Sankar et al. (91) in der Literatur beschrieben, welche meist klinisch nicht nutzbar sind, da ihr Nachweis entweder zu teuer ist oder eine zu geringe Sensitivität aufweist. An dem Freiburger Fraunhofer-Institut für physikalische Messtechnik wurden Biochips entwickelt, die mit verschiedenen Biomarkern in 20 Minuten die Diagnose Sepsis aus dem Blutplasma stellen sollen (32,33).

Im Alltag gilt das Procalcitonin (PCT), eine 116 Aminosäuren lange Vorstufe des Hormones Calcitonin, als einer der am weitesten akzeptierten diagnostischen Parameter (27,83,84,108). Auch wird PCT zur Prognoseabschätzung bei Sepsis verwendet (44) und wurde dafür 2005 von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen. Mit einem PCT-Monitoring kann die Zeitspanne einer Antibiotikagabe bei septischen Patienten verkürzt werden (14,83). Interleukin 6 (IL6) und das C-reaktive Protein (CRP) werden in der medizinischen Routine ebenfalls zur Diagnosesicherung der Sepsis, sowie IL6 zur Schweregradeinschätzung der Sepsis verwendet (46). Ein löslicher Tumornekrosefaktor-Apoptose-induzierender-Ligand (sTrail) scheint für die Vorhersage der Schwere einer Sepsis und deren Mortalität einen positiven Zusammenhang zu zeigen (106). Auch der Abfall der monozytären HLA-DR-Expression wird neuerdings als ein Marker zum Monitoring der Schwere der Sepsis und Immunsuppression gesehen (70).

### 1.4 Ziel der Arbeit

Ein Marker, der auf die Folgen einer fehlenden zellulären Abräumfunktion bei Sepsis hinweist, ist bisher nicht bekannt.

Ziel dieser Dissertationsarbeit ist es, die Gesamtheit der Mikropartikel, welche hier unter dem Oberbegriff phagozytosepflichtiges Material zusammengefasst werden, quantitativ zu erfassen. Dabei soll außer Acht gelassen werden, welchen Ursprungs diese Bruchstücke sind. Hierzu soll ein Assay zum quantitativen Nachweis von Mikropartikeln entwickelt und dessen Ablauf vereinfacht und optimiert werden. Nach dem Aufbau eines solchen Assays mit *in-vitro*-Testreihen soll das phagozytosepflichtige Material von septischen Patienten der Intensivstation und freiwilligen gesunden Probanden quantifiziert und verglichen werden.

## **2. Material und Methoden**

Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene Konzepte verfolgt: ein ELISA-Konzept und ein Fluoreszenzfarbstoffkonzept. Als Vorteil des ELISA-Konzeptes wurde die universelle Zielstruktur der Antikörper gesehen. Das Fluoreszenzkonzept schien in Handhabung und Ablauf einfacher durchzuführen.

Die ausführlichen Probenmessungen, die zugehörigen Statistiken und das Protokoll befinden sich im Anhang unter Punkt 7.

### **2.1 ELISA - Konzept**

In diesem Teil der Promotionsarbeit wird untersucht werden, ob sich mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) Membranbruchstücke quantitativ messen lassen.

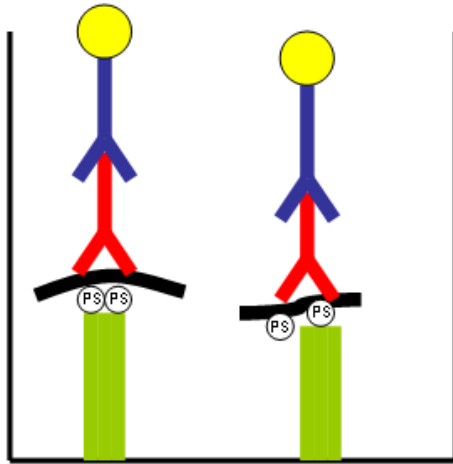
Zellmembranen weisen in intakter Form eine Asymmetrie auf und verlieren diese bei dem Untergang der Zelle. Phosphatidylserin (PS), welches sich nur auf der Innenseite aller Membranen befindet, kann mit Annexin V detektiert werden. Bei funktionstüchtigen Zellen ist dieses PS auf der Innenseite für Annexin V nicht zugänglich.

Für den Sandwich-ELISA (Abb. 4) wird nun Annexin V auf dem Boden einer Mikrotiterplatte fixiert werden und die Membranbruchstücke an sich binden. Die Membranbruchstücke können wiederum mit einem Antikörper gegen die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nachgewiesen werden. Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase kommt auf den Zellmembranen aller Zellen vor. Dieser Antikörper wird nun mit einem sekundären Antikörper, welcher enzymmarkiert ist, nachgewiesen werden (Abb. 4). Dieses Enzym ist eine Meerrettich-Peroxidase, die dann wieder durch Spaltung eines Farbstoffes nachgewiesen werden kann. Dieser Farbumschlag kann fotometrisch ermittelt und eine quantitative Aussage über die Menge der gebundenen Membranbruchstücke gemacht werden. In den Zwischenschritten werden nicht gebundene Partikel abgewaschen.

Ausführliche Versuchsprotokolle befinden sich im Anhang (siehe Punkt 7.) Die Durchführung wird exemplarisch in 2.1 a dargestellt und ist für die nachfolgenden Versuche analog. Dabei entspricht n der Anzahl der in einem Versuch durchgeführten Parallelansätze.

Als Orientierung diente das Praxishandbuch "Gute Elisa-Praxis" der Firma rBiopharm (85).





**Abb. 4: Schematischer Versuchsaufbau**

gelb: Horseradish Peroxidase konjugiert mit  
 blau: Goat-anti-Maus-AK  
 rot: muriner AK gegen die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  
 schwarz: Membranbruchstücke mit Phosphatidylserin (PS) an der Außenseite  
 grün: Annexin V

## 2.1 a ELISA zum Nachweis von Zellbruchstücken mit Annexin V als Rezeptor

für PS und einem AK gegen die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase- $\alpha_1$

n = 2

### Material

1. Purified recombinant Annexin V, BD Biosciences, San Diego, USA, N<sup>o</sup>. 556416,
2. Dulbecco's Medium (DMEM) without phenol red, Gibco/Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA, N<sup>o</sup>. 11880- 028,
3. Tween 20 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate), Sigma, Steinheim, Chemical, N<sup>o</sup>. P-7949,
4. Zellen: 4 ml C<sub>3</sub>A Hepatoma (adhärente Leber Ca-Zellen) human,  $17,8 \times 10^6$  Zellen in 4 ml  $\Rightarrow 4,45 \times 10^6$  Zellen pro ml, 95 % Vitalität,
5. Monoclonal Antibody gegen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase- $\alpha_1$ , Alexis, Lörrach, Deutschland, N<sup>o</sup>.: 804-080-R80,
6. Goat anti-mouse HRPO conjugated secondary antibody, BD Bioscience, San Diego, USA, N<sup>o</sup>: 610094,
7. TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) Substrate, Immunotech, Beckmann Coulter Company, Marseille, Frankreich
8. 96 Well Mikrotiterplatte mit Abdeckplatte, TC, steril, Greiner Labortechnik Cellstar<sup>®</sup>, N<sup>o</sup>: 655180,
9. Pipetten und Spitzen verschiedener Größen,
10. Albumin aus Rinderblut, Merck, Darmstadt, N<sup>o</sup>: 12018,
11.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 molar),
12. Eppendorf-Zentrifuge.



## Durchführung

I. Ansetzen einer Lösung aus 62 µl Annexin V und 3 x 855 µl Dulbecco's Medium w/o phenol red (siehe Substanzen 1. und 2. oben). Es werden je 200 µl dieser Lösung in die Wells B<sub>1</sub> bis G<sub>2</sub> gegeben (siehe Abbildung) und bei Raumluft eine Stunde inkubiert. Es erfolgt eine weitere Stunde Inkubation im Wärmeschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, weil das Dulbecco Medium mit der Raumluft reagiert und so zu pH-Veränderungen führen würde.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	O	O	-	-	-	-	-	-	-	-	O	O
B	●	●	-	-	-	-	-	-	-	-	O	O
C	●	●	-	-	-	-	-	-	-	-	-	O
D	●	●	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	●	●	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	●	●	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	●	●	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	O	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

● je 200 µl Lösung  
O keine Lösung  
- kein Gebrauch dieses Wells

II. Die Ansetzung der 0,5%igen Rinderalbumin-Lösung erfolgt durch Gabe von 0,1 g BSA in 20 ml DMEM und stellt den nächsten Schritt dar. Diese Lösung wird so lang mit dem Magnetrührer gerührt, bis alles gelöst ist. Dann kommt die fertige Suspension bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in den Wärmeschrank.

III. 200 ml 0,1 %ige Tweenlösung werden angesetzt (200 µl Tween auf 200 ml Dulbecco's Medium). Anschließend erfolgt eine Behandlung mit dem Magnetrührer bis alles gelöst ist.

IV. Die unter I.) hergestellte Mikrotiterplatte wird nach insgesamt zwei Stunden Inkubationszeit mit der unter III.) hergestellten Pufferlösung 3x gewaschen. Das DMEM schafft außerdem eine ideale Voraussetzung für die Bindung der Zellmembranbruchstücke am Annexin V (stabiler pH, Anwesenheit von Caliziumionen).

V. Darauf werden 250 µl Rinderalbumin in die Wells A<sub>1</sub> bis H<sub>2</sub> gegeben, um die unspezifische Bindung der Proteine zu unterbinden. Dann erfolgt eine Inkubation von 30 Min. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Wärmeschrank.

VI. Von den 4 ml C<sub>3</sub>A Hepatoma-Zellen (siehe 4.) wird die eine Hälfte lysiert (durch dreimaliges Auftauen und Einfrieren) und die andere Hälfte wird in unbeschädigtem Zustand verwendet. Beide Ansätze werden so verdünnt, dass jeweils eine Konzentration von nicht mehr als  $5 \times 10^5$  Zellen/ml zu finden ist: 2 ml Zellsuspension + 15,8 ml DMEM.

VII. Es erfolgen Waschschrte der Mikrotiterplatte mit dreimal Tween und zweimal DMEM und

VIII. ein Ansetzen einer Verdünnungsreihe mit den unter VI beschriebenen Zellsuspensionen:

A	<b>100 % lebend</b>	200 µl lebende Zellen	0 µl tote Zellen
B	<b>75 % lebend</b>	150 µl lebende Zellen	50 µl tote Zellen
C	<b>50 % lebend</b>	100 µl lebende Zellen	100 µl tote Zellen
D	<b>25 % lebend</b>	50 µl lebende Zellen	150 µl tote Zellen
E	<b>0 % lebend</b>	0 µl lebende Zellen	200 µl tote Zellen
F	<b>100 % tot*</b>	0 µl lebende Zellen	200 µl tote Zellen

\* kein Annexin V

Anmerkung: In die Wells A<sub>1</sub> bis B<sub>2</sub> kommen keine Zellen. Alle Ansätze werden doppelt in der ersten und zweiten Spalte angesetzt.

IX. Es erfolgt eine Inkubation von 35 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

X. Als Kontrolle werden in die Wells A<sub>11</sub> bis B<sub>12</sub> jeweils zwei Ansätze mit 100 % lebenden und 100 % toten Zellen gegeben, aus Schritt VI ohne Albuminvorbehandlung der Wells.

XI. Nach einer Inkubationszeit von 35 Minuten wird 3x mit DMEM gewaschen.

XII. Es werden 2,1 ml aus 2,08 ml DMEM und 21 µl Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-Antikörper angesetzt. (1:100 Antikörpervedünnung)

XIII. Nun werden jeweils 100 µl in jedes der 20 Wells gegeben und die verbleibenden ca. 50 µl werden als weitere Kontrolle in das Well C<sub>12</sub> gegeben.

XIV. Es folgt eine weitere Inkubation von einer Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Wärmeschrank. Eine Zwischenbetrachtung der Zellen unter dem Mikroskop findet statt. Am Rand der Wells sind vereinzelt Zellen zu erkennen.

XV. Der Goat-anti-mouse-Antikörper wird in einer Verdünnung von 1: 1000 angesetzt.

XVI. Wieder erfolgen drei Waschschrte der Mikrotiterplatte mit DMEM.

XVII. Von dem unter XV. angesetzten Antikörper werden je 200µl in alle 21 Wells gegeben und 90 Minuten bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

XVIII. Erneutes dreimaliges Waschen mit DMEM.

XIX. Es werden je 100 µl TMB (siehe 7.) in die Wells gegeben.

XX. Nach sehr schnell erfolgtem Farbumschlag nach blau wird eine fotometrische Messung bei 620 nm durchgeführt.

XXI. Kurz darauf erfolgt eine Abstopfung dieser Farbumschlagreaktion mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Daraufhin erfolgt ein Farbumschlag nach gelb.

XXII. Es erfolgt eine weitere fotometrische Messung bei 405 nm.



**Abb. 5: Versuchsgefäß in Form einer 96-Well-Platte**

**2.1 b ELISA zum Nachweis von Zellbruchstücken unter Einsatz eines anderen Antiköpers gegen die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase-α und mit HL60 Zellen** **n = 2**

**Material**

wie 2.1 a und Wechsel zu

1. Ca-haltigem Puffer,
2. neuer monoklonaler AK: Monoclonal Antibody to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase-α , Alexis, Lörrach, Deutschland, N<sup>o</sup>.: 804-081-R80, Lot: L10329,
3. HL60-Zellen statt C<sub>3</sub>A-Zellen,
4. Ziegenserum als Blocker, Goat-Serum, Gibco, 100ml N<sup>o</sup>: 16210-064.

**2.1 c Austestung verschiedener Blocker: Rinderalbumin (BSA), Ziegeneserum und Ziegen IgG** **n = 4**

**Material**

1. Goat-Serum, Gibco, 100ml N<sup>o</sup>: 16210-064,
2. Goat IgG purified Immunoglobulin from serum,
3. Albumin aus Rinderblut (BSA), Merck, Darmstadt, N<sup>o</sup>: 12018,
4. Antikörper wie in Versuch 2.1 a.

**2.1 d Überprüfung der unspezifischen Bindungen im ELISA durch einen Versuchsansatz mit und ohne Zellen und Tween als neuem Blocker** **n = 2/4**

Tween 20, Polysorbat-20, ist ein nichtionisches Tensid, welches ein anerkanntes Detergens in Immunoassays (Western Blot, ELISA) zur Verhinderung unspezifischer Bindungen ist. Hierdurch wird die spezifische Bindung der eingesetzten Antikörper verstärkt.

**Material**

wie 2.1 a, aber

1. Tween 20 als Waschsubstanz,
2. Abcam, San Francisco, USA, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase Antikörper, Nr. ab353, (2. AK),
3. Dianova, Hamburg, Deutschland, Alkalische Phosphatase konjugierter Esel-anti-Huhn-Antikörper (IgG), Nr. 703-055-155, Lot: 54193, 0,5 ml (als 3. AK),
4. Farbstofftabletten, Paranitrophenylphosphat, Nr. N-2640, Lot: 019H-8251.

Genaue Durchführungsbeschreibung siehe Anhang 7.2.1 d

**2.1 e Überprüfung weiterer unspezifischer Bindungen zwischen dem 1. und 3. sowie dem 2. und 3. Antikörper, um mögliche unspezifische Bindungen auszuschließen oder zu minimieren** **n = 4**

Da jeder Antikörper auch unspezifisch bindet, aber die Menge der unspezifischen Bindungen nicht bekannt ist, wird hier ein Zwischenversuch gemacht, in dem die einzelnen Antikörper mit und ohne Zelllysat inkubiert werden, um die Menge der unspezifischen Bindungen einschätzen zu können. Aus den gewonnenen Erkenntnissen sollen dann ggf. Änderungen im Versuchsablauf vorgenommen werden.

**Material**

wie 2.1 d

- 2.1 f Optimierung der verschiedenen Blockerkonzentrationen von BSA und Ermittlung der besten Inkubationszeit** **n = 8**  
**Material**  
 wie 2.1 d und BSA in verschiedenen Konzentrationen
- 2.1 g ELISA mit optimierten Konzentrationen, Blockern und Inkubationszeiten** **n = 3**  
**Material**  
 wie 2.1 d
- 2.1 h Einfluß von Tween auf die Zellmembran und damit auf die Vitalität der HL60-Zellen** **n = 16**  
**Material**  
 1. HL60-Zellen, wie in den Vorversuchen,  
 2. Tween in unterschiedlichen Verdünnungen,  
 3. Trypanblau, Lichtmikroskop, Neubauer-Zählkammer.
- 2.1 i Optimierter ELISA, mit vorherigem Waschen der Zellen** **n = 2**  
**Material**  
 wie 2.1 d
- 2.1 j Prüfung der mechanischen Resistenz von differenzierten und undifferenzierten Zellen durch verschiedenen Chemikalien bzw. Temperatur** **n= 1**  
  
 Genaue Material- Durchführungsbeschreibung siehe Anhang 7.2.1 j
- 2.1 k Ermittlung der Resistenz der HL60-Zellen gegen Ultraschall im Wasserbad, nach unterschiedlichen Inkubationszeiten** **n = 16**  
**Material**  
 1. HL60 Zellen,  
 2. Ultraschallbad mit regulierbarer Zeit und Intensität des einwirkenden Ultraschalls,  
 3. Trypanblau,  
 4. Mikroskop mit Neubauer-Zählkammer,  
 5. verschiedene Pipetten und Spitzen,  
 6. Gehörschutz.

### **Durchführung:**

Es wird die Resistenz der HL-60-Zellen nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten (20, 10, 5 Sekunden bei einer 40%igen Intensität des Gerätes) gegen Schallwellen im Ultraschallbad gemessen. In der Neubauer-Zählkammer werden die vitalen Zellen gezählt und die durch Ultraschall entstandenen Bruchstücke ermittelt.

#### **2.1 i Optimierter ELISA**

**n = 2 x 4**

##### **Material**

wie 2.1 d, jedoch mit

- 1 . Albumin aus Rinderblut (BSA), Merck, Darmstadt, N<sup>o</sup>: 12018,
2. durch Ultraschall lysierte HL60-Zellen.

#### **2.1 m Optimierter ELISA**

**n = 3 x 4**

##### **Material**

wie 2.1 k jedoch mit Tween 0,1% für die Zellen

#### **2.1 n Erstellung einer Standardkurve unter optimierten Bedingungen**

**n = 3**

##### **Material**

wie 2.1 k mit Tween 0,1% für die Zellen

### **Überprüfung der erwarteten AK-Bindung mittels Durchflusszytometrie, FACS (fluorescence activated cell sorting).**

Hierbei werden die Zellen bzw. deren Bruchstücke einzeln einem Laserstrahl ausgesetzt. Anhand der Beugung des Lichtes im Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) kann man auf die Größe der Zellen/Partikel schließen. Die Brechung des Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards Scatter) ist ein Maß für die Granularität der Zellen. So lassen sich anhand der Eigenschaften die untersuchten Partikel unterscheiden. Zusätzlich gibt es noch die Möglichkeit, mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern bestimmte Zielstrukturen der Zellen zu markieren und damit in nahezu unendlich vielen Varianten nachzuweisen. Hier sollen unsere Partikel und die Antikörper bzw. deren spezifische und unspezifische Bindungen getestet werden.

Außerdem kann man mit „Standard-Partikeln“ mit einer genau vorgegebenen Größe eine Messskala und damit eine Größenbestimmung der zu untersuchenden Partikel durchführen.

**2.1 o Bestimmung der Streulichteigenschaften von lysierten HL60-Zellen mittels n=4 FACS in Abhängigkeit von der Zerstörungszeit im Ultraschallbad in Sekunden**

Genaue Material- Durchführungsbeschreibung siehe Anhang 7.2.1 o

**2.1 p Überprüfung der erwarteten AK-Bindungen mittels FACS n =4**

**Material**

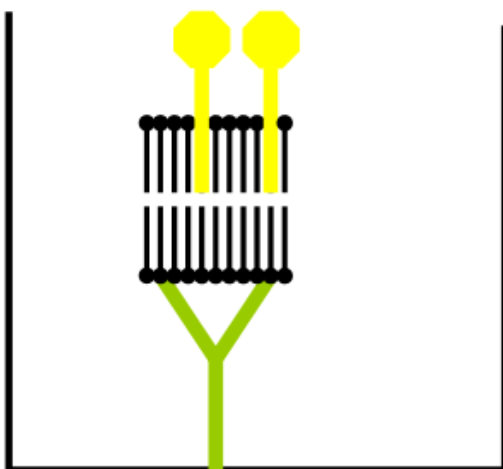
wie 7.2.1 o

**Überprüfung der erwarteten AK-Bindungen mittels FACS mit einer 360 Sekunden Zellzerstörungszeit bei 75% Intensität des Gerätes**

Genaue Material- Durchführungsbeschreibung siehe Anhang 7.2.1 p

**2.2 Fluoreszenzfarbstoff - Konzept**

Wegen der hohen unspezifischen Bindung des 2. Antikörpers im ELISA-Test wird statt des 2. AK der Farbstoff PKH2-GL eingeführt. Dies ist ein grünleuchtender ampholytärer Fluoreszenzfarbstoff, der die Lipiddoppelschichten von allen Membranen und deren Bruchstücken nachweist. Der Farbstoff markiert auch lebende Zellen, diese Zellen müssen daher vor dem Versuch entfernt werden. Da der Farbstoff an alle ampholytären (lipophil und lipophob) Strukturen bindet, ist eine ausgiebige Waschung vor den einzelnen Versuchsschritten notwendig, um nur die gewünschten Zielstrukturen nachzuweisen.



**Abb. 6: Schematischer Versuchsaufbau mit ampholytärem Farbstoff**

gelb: ampholytärer PKH2-GL-Farbstoff  
schwarz: Lipid-Doppelmembran bzw. deren Bruchstücke  
grün: AK gegen die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase

**2.2 a Modifikation des Assays nach 2.1 durch Einführung des Farbstoffes PKH2-GL anstelle des 2. Antikörpers** **n =3**

**Material**

1. PBS-Puffer, Standard aus der Zentralapotheke, 500 ml,
2. Sigma, Steinheim, Tween 20, Nr. P1379,
3. Monoclonal Antibody to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase- $\alpha$  , Alexis, N<sup>o</sup>.: 804-081-R80,
4. matte, schwarze Mikrotiterplatte, TC, steril, Greiner Labortechnik Cellstar<sup>®</sup>,
5. Pipetten und Spitzen verschiedene Größen
6. destilliertes steriles Wasser
7. ca. 5 ml HL60 Zellen, ca.  $1 \times 10^7$  Zellen pro ml, 94% Vitalität, Medium mit 10% Kälberserum (FKS), 1% Glutamin und DMEM ohne Phenolrot
8. Albumin aus Rinderblut (BSA), Merck, Darmstadt, N<sup>o</sup>: 12018
9. Ultraschallbad (regulierbar) mit Gehörschutz
10. PKH2-GL, Sigma, Saint Louis, USA, Green Fluorescent Cell Linker Kit, Fluoreszenz-Farbstoff (fl-F)
11. Schüttler, Zentrifuge (hier Eppendorf), Waage.

	1	2	3	4	5
A	1. AK	1. AK	---	---	1. AK
B	heile Zellen	Zelllysate	heile Zellen	---	---
C	fl. F	fl. F	---	fl. F	fl. F

**2.2 b Optimierung des PKH2-GL-Assays mit reduzierter Zellzahl** **n = 2 x 3**

**Material**

wie 2.2 a

**2.2 c Austausch von Rinderalbumin als Blocker gegen Tween 20** **n = 3**

**Material**

wie 2.2 a jedoch mit

1. Sigma, Steinheim, Deutschland, Tween 20, Nr. P1379

**2.2 d Zwischenversuch zur Blockertestung. Getestet werden: kein Blocker, BSA, Tween 0,1% und Tween 0,01% und Ziegen-IgG.** **n = 4**



### **Material**

1. PBS-Puffer, Standard aus der Zentralapotheke, 500 ml,
2. Sigma, Steinheim, Deutschland, Tween 20, Nr. P1379,
3. schwarze-Mikrotiterplatte, TC, steril, Greiner Labortechnik Cellstar<sup>®</sup>,
4. Pipetten und Spitzen verschiedene Größen,
5. Albumin aus Rinderblut (BSA), Merck, Darmstadt, N<sup>o</sup>: 12018,
6. Ziegen-Serum, Gibco, 100 ml, No. 16210-064,
7. PKH2-GL, Sigma, Steinheim, Deutschland Green Fluorescent Cell Linker Kit, Farbstoff
8. Schüttler, Waage.

#### **2.2 e Optimierung des Tests ohne Notwendigkeit einer Blockung von unerwünschten Bindungen. n = 2 x 4**

##### **Material**

wie 2.2 a jedoch ohne Blockung und 1. AK, dafür mehrere Gefäße zum Waschen. Parallel werden eine schwarze matte und eine glatte Mikrotiterplatte getestet, um den Einfluss der Eigenfluoreszenz der Testplatten einschätzen zu können.

##### **Durchführung:**

Hier wird das modifizierte Assay-Prinzip nach 2.2 mit Antikörper und Fluoreszenzfarbstoff verlassen, da die unspezifischen Bindungen eine nicht zu beherrschende Größe darstellen. Ansonsten gleicht die Durchführung dem Versuch 2.2 a.

#### **2.2 f Optimierung des Tests ohne Notwendigkeit einer Blockung mit höherer G-Zahl beim Zentrifugieren n = 4**

##### **Material**

wie 2.2 e

#### **2.2 g Änderung in der Abfolge der Versuchsschritte: Es wird zuerst gefärbt und anschließend werden die HL60-Zellen lysiert n = 4**

##### **Material**

wie 2.2 e

#### **2.2 h Resistenz der HL60-Zellen gegen destilliertes Wasser**

Mit dem LIVE/DEAD-Farbstoff ist eine Anfärbung von intakten Zellen und solchen, die eine beschädigte Zellmembran haben, möglich. Ohne Waschschr

grüne (intakte Zellmembran) oder rote Zellen (beschädigte oder lysierte Zellmembran, im weiteren allgemein als Zelllysate bezeichnet) unter dem Mikroskop unterscheiden.

### **Material**

1. Pipetten und Spitzen verschiedener Größen,
2. destilliertes steriles Wasser,
3. ca. 5 ml HL60 Zellen, ca.  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml, Medium mit 10% Kälberserum (FKS), 1% Glutamin und DMEM ohne Phenolrot,
4. Deckgläser, Durchlicht-Mikroskop bis 4000 fache Vergrößerung, Objektträger,
5. LIVE/DEAD<sup>®</sup> Viability/Cytotoxicity Kit (L-3224), Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland.

### **Durchführung**

Die HL60-Zellen werden in destilliertes Wasser gegeben, worauf diese sofort platzen. Die Inkubationszeit spielt folglich keine Rolle. Mit dem LIVE/DEAD-Test wird die Zerstörung unter dem Mikroskop überprüft.

## **2.2 i Optimierung des Ansatzes mit in destilliertem Wasser lysierten Zellen, wie unter 2.2 h beschrieben n = 2 x 4**

### **Material**

1. PBS-Puffer aus der Zentralapotheke, 500 ml, Ca und Mg-Ionen frei,
2. Pipetten und Spitzen verschiedener Größen,
3. destilliertes steriles Wasser,
4. ca. 5 ml HL60 Zellen, ca.  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml, Medium mit 10% Kälberserum (FKS), 1% Glutamin und DMEM ohne Phenolrot,
5. Deckgläser, Durchlicht-Mikroskop bis 4000 fache Vergrößerung, Objektträger,
6. Trypanblau,
7. Albumin aus Rinderblut (BSA), Merck, Darmstadt, N<sup>o</sup>: 12018,
8. Diluent A aus Cell Linker Kit (siehe 10 (zum PKH2-GL-Farbstoff gehörend)) Sigma, Saint Louis, USA,
9. matte, schwarze Mikrotiterplatte, TC, steril, Greiner Labortechnik Cellstar<sup>®</sup>,
10. PKH2-GL, Sigma, Saint Louis, USA, Green Fluorescent Cell Linker Kit, Farbstoff,
11. Schüttler, Beckmann-Zentrifuge mit bis zu 15 000G, Waage,
12. Fluorometer, Fluoroscanner Ascent<sup>®</sup>, Vaanta, Finnland, Kat.Nr. 1506450.

**2.2 j Weitere Testoptimierungen, ansonsten Ablauf wie unter 2.2 i beschrieben n = 4**

**Material**

wie 2.2 i

**Durchführung:**

Es werden die Unterschiede zwischen 13.000 und 20.000 Umdrehungen/Min ermittelt

**2.2 k Optimierung der Zentrifugation und der Farbstoffverdünnung n = 2 x 8**

**Material**

wie 2.2 i

**2.2 l Weitere Optimierung der Drehzahl beim Zentrifugieren zur Erhöhung der Bruchstückzahl n = 2 x 4**

**Material**

wie 2.2 i

**2.2 m Erstellung der Standardreihe mit lysierten HL60-Zellen n = 2 x 12**

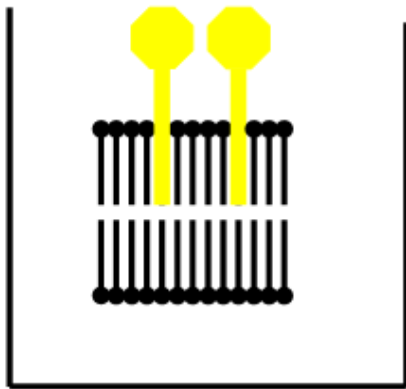
**2.2 n Begrenzung der Zentrifugation auf 15 000G n = 56**

**Material**

1. PBS-Puffer aus der Zentralapotheke, 500 ml, Ca und Mg-Ionen frei,
2. Pipetten und Spitzen verschiedener Größen,
3. destilliertes steriles Wasser,
4. ca. 5 ml HL60 Zellen, ca.  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml, ca. 95% Vitalität, Medium mit 10% Kälberserum (FKS), 1% Glutamin und DMEM ohne Phenolrot,
5. Deckgläser, Mikroskop, Objektträger, Rundröhrchen (2ml),
6. Trypanblau,
7. Albumin aus Rinderblut (**BSA**), Merck, Darmstadt, N<sup>o</sup>: 12018,
8. Diluent A aus Cell Linker Kit (siehe 10) Sigma, Saint Louis, USA,
9. schwarze-Mikrotiterplatte, TC, steril, Greiner Labortechnik Cellstar<sup>®</sup>,
10. PKH2-GL, Sigma, Saint Louis, USA, Green Fluorescent Cell Linker Kit, Farbstoff,
11. Schüttler, Zentrifugen (mit bis zu 15 000 G), Waage,
12. Fluorometer, Fluoroscant<sup>®</sup>, Vaanta, Finnland, Kat.Nr. 1506450, mit einer Exzitation bei 485 nm und einer Emission bei 538 nm

## **2.3 Standardkurvenerstellung für die PKH2-GL-basierte Methode**

Nach Verlassen des zuerst beschriebenen ELISA-Prinzipes und erfolgreichem quantitativen Nachweis von Membranstücken, werden nun Standardkurven unter Nutzung des Fluoreszenzfarbstoffes PKH2-GL erstellt. Hierbei sollen bei den verschiedenen Standardkurven „blutplasmaähnliche“ Bedingungen simuliert werden, die den Patientenproben in ihren Eigenschaften am ehesten nahe kommen.



**Abb. 7: Schematischer Versuchsaufbau mit ampholytarem Farbstoff ohne Antikörper**

gelb: ampholytärer PKH2-GL-Farbstoff  
schwarz: Lipiddoppelmembran bzw. deren Bruchstücke

### **2.3 a Erstellung einer Eichkurve mit HL60-Zellen in wässrigem Medium**

Genaue Material- und Durchführungsbeschreibung siehe Anhang 7.2.3 a



**Abb 8: Ascent- Fluorometer mit geöffneter Schublade für die 96-Well-Platte**

### **2.3 b Erstellung einer Standardkurve mit PKH2-GL-beschichteten Latexkugeln in wässrigem Medium**

**n = 24**

Genaue Material- und Durchführungsbeschreibung siehe Anhang 7.2.3 b

**2.3 c Erstellung einer Standardkurve mit PKH2-GL-beschichteten Latexkugeln in Plasma-ähnlichem Medium (Biseko)**

**n = je 5 x 4**

Genaue Material- und Durchführungsbeschreibung siehe Anhang 7.2.3 c

## **2.4 Messung von klinischen Proben**

### **Gewinnung der klinischen Proben**

Sie erfolgt von gesunden bzw. kranken Spendern, die jeweils zwischen 18 und 80 Jahren alt sein müssen. Es werden jeweils 2,5 ml in einem Lithium-Heparinröhrchen mit der täglichen Routineblutentnahme abgenommen. Die Abnahme erfolgt ohne lange venöse Stauung und wird, um eventuelle Tagesunterschiede der Proben zu vermeiden, immer um 11 Uhr vormittags durchgeführt. Die Proben werden ohne lange Zwischenlagerung bei 2 500 G für 15 Minuten zentrifugiert und dann anschließend von den Zellen getrennt. Die zellfreien Proben werden jetzt bei –30°C eingefroren. Es ist wichtig, dass die Zellen vor dem Einfrieren entfernt werden, damit nicht zusätzliche Bruchstücke durch Zellzerfall entstehen. Bei folgenden Gruppen werden Proben entnommen. Ein Votum der Ethikkommission liegt unter der Reg.-Nr. II HV 28/2003 vor. (in Klammern die Anzahl der Proben):

Kontrollgruppe (22): es dürfen keine Vorerkrankungen/Medikamente bekannt sein, die die Zellbruchstückmenge im Plasma beeinflussen könnten

Sepsispatienten (26): die vorgenannten Kriterien einer schweren Sepsis müssen erfüllt sein, Aufenthalt auf Intensivstationen der Universität Rostock (hierbei sind chirurgische oder internistische Krankheitsbilder möglich)

Sepsispatienten mit einer gesicherten E-coli-Sepsis (3): Kriterien, wie vorgenannt mit Keimnachweis in der Blutkultur

Malaria tropica (10): ausgeprägte Hämolyse bei schweren Malariaverläufen mit Sepsis. Diese Proben wurden freundlicherweise von PD Dr. med. Christoph Hemmer, Abteilung für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin, zur Verfügung gestellt. Ein entsprechendes Votum von der Ethikkommission liegt unter der Nummer II HV 09/2000 vor.

### **Messung der Patientenproben**

**n = je 4**

Die Messung der unter 2.4 a gewonnenen Proben erfolgt analog der unter 2.3 a beschriebenen Behandlung der lysierten Zellen.

## **2.5 Statistische Auswertung**

Die Statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS 15.0 BM Corporation, Route 100 Somers, NY 10589. In den Versuchreihen 2.1 und 2.2 wurde überwiegend, um einen schnellen Erkenntnisgewinn zu erhalten, mit kleinen Fallzahlen gearbeitet, die eine Anwendung nichtparametrischer Tests notwendig machen, da man hier nicht von einer glockenförmigen Normalverteilung ausgehen kann. Korrelationen werden bestimmt nach:

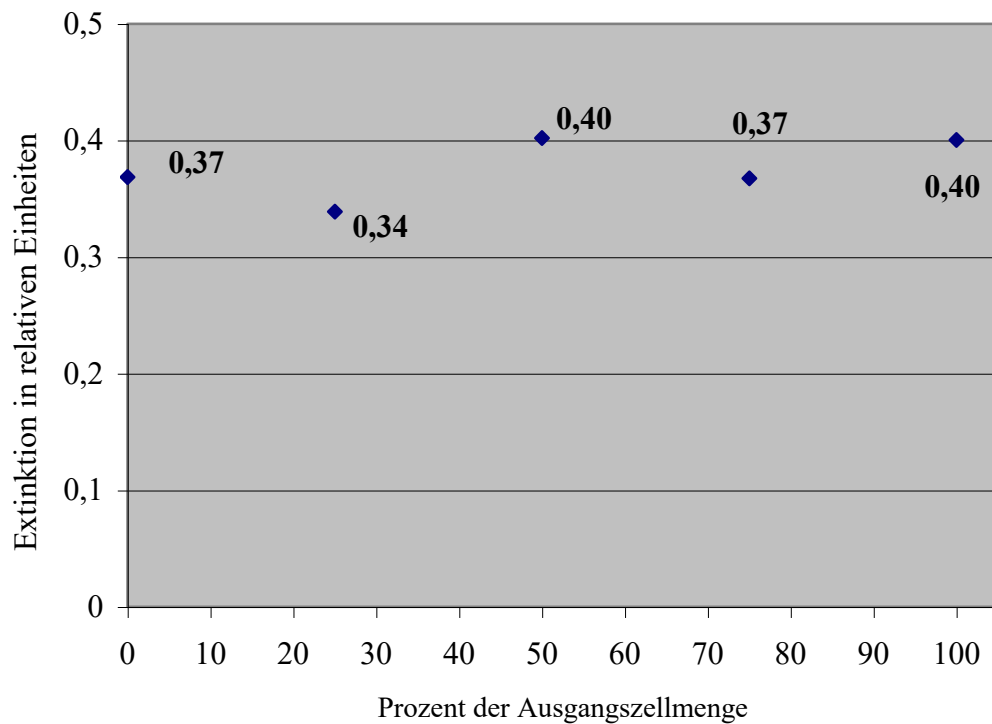
- Kruskal-Wallis-Test für mehrere nichtverbundene Stichproben
- Spearman-Rho für Korrelationsanalysen mit linearem Zusammenhang
- Mann-Whitney-Test zum paarweisen Vergleich einzelner Gruppen untereinander

Eine Signifikanz,  $p$ , liegt für  $p < 0,05$  vor.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 ELISA - Konzept

##### 3.1 a ELISA zum Nachweis von Zellbruchstücken mit Annexin V als Rezeptor für PS und einem AK gegen die $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase- $\alpha_1$



**Abb 9: Messung der Extinktion in Abhängigkeit von der Menge der Ausgangszellmenge mit Phosphatidylserin als Zielstruktur. Ausgangszellmenge  $4,45 \times 10^6/\text{ml}$ . Es wurden je zwei Parallelmessungen durchgeführt.**

Eine Korrelation (**Spearman-Rho**) zwischen dem Anteil toter Zellen und der Extinktion ( $p=0,28$  bzw.  $0,51$ ) ist nicht gegeben.

##### 3.1 b ELISA zum Nachweis von Zellbruchstücken unter Einsatz eines anderen Antiköpers gegen die $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase- $\alpha$ und mit HL60 Zellen

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei den Extinktionen für die unterschiedlichen Mengen an Zellfragmenten.

Ausführliche Ergebnisse: siehe Anhang 7.3.1 b

### **3.1 c Austestung verschiedener Blocker: Rinderalbumin (BSA), Ziegenserum und Ziegen IgG**

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei der Austestung der verschiedenen Blocker. Alle Blocker erfüllen ihre Funktion unzureichend.

Die ausführlichen Ergebnisse befinden sich im Anhang 7.3.1 c.

### **3.1 d Überprüfung der unspezifischen Bindungen im ELISA durch einen Versuchsansatz mit und ohne Zellen und Tween als neuem Blocker**

- Das System funktioniert, die Alkalische Phosphatase im Puffer arbeitet.
- Die Blockung mit Tween 20 ist in Ordnung für den 3. AK, aber Zellprotein hat sich stark abgelagert.
- Eine Kreuzreaktivität zwischen dem 3. und 1. AK ist wahrscheinlich vorhanden, evtl. auch 2. AK.
- Generell ist die Blockung noch nicht ausreichend.

Die ausführlichen Ergebnisse befinden sich im Anhang 7.3.1 d.

### **3.1 e Überprüfung weiterer unspezifischer Bindungen zwischen dem 1. und 3. sowie dem 2. und 3. Antikörper**

- Der zweite Antikörper weist eine hohe unspezifische Bindung auf.
- Die Blockung ist unzureichend.

Die ausführlichen Ergebnisse befinden sich im Anhang 7.3.1 e.

### **3.1 f Optimierung der verschiedenen Blockerkonzentrationen und Ermittlung der besten Inkubationszeit**

- Zwischen den getesteten Blockzeiten gibt es keinen signifikanten Unterschied.
- Eine Erhöhung der Blockerkonzentration bringt in unserem Versuch keine Vorteile.

Die ausführlichen Ergebnisse befinden sich im Anhang 7.3.1 f.



### 3.1 g ELISA mit optimierten Konzentrationen, Blockern und Inkubationszeiten

- Ohne den 1. AK sind die Extinktionswerte höher als mit dem 1. AK.
- Die Extinktionswerte sinken mit steigender Verdünnung.
- Auch mit einer 1:1 Verdünnung würde der Farbpuffer noch einen ausreichend hohen Extinktionswert ergeben

Die ausführlichen Ergebnisse befinden sich im Anhang 7.3.1 g.

### 3.1 h Einfluss von Tween auf die Zellmembran und damit die Vitalität der HL60-Zellen

Tabelle 1: Zellvitalität in Prozent der Ausgangszellmenge nach 10 Minuten Inkubation mit Tween in verschiedenen Konzentrationen

n-Konzentration	Vitalität
10%	90,77 %
5 %	91,23 %
0,5 %	91,30 %
0,1%	95,74%

### 3.1 i Optimierter ELISA, nach vorherigem Waschen der Zellen

- Das Waschen des Mediums reduziert die unspezifischen Bindungen.
- Das Nährmedium weist eine hohe unspezifische Bindungsfähigkeit auf.
- Tween fördert unspezifische Bindungen, statt diese zu reduzieren.

Die ausführlichen Ergebnisse befinden sich im Anhang 7.3.1 i.

### 3.1 j Prüfung der mechanischen Resistenz von differenzierten und undifferenzierten Zellen durch verschiedenen Chemikalien bzw. Temperatur

Tab 2: Vitalität in Abhängigkeit von der 30minütigen Exposition mit dem entsprechenden Detergenz

	Differenzierte Zellen		Undifferenzierte Zellen	
<b>C<sub>12</sub>E<sub>8</sub></b>	30%	40%	100%	20%
<b>50% Tween/50%C<sub>12</sub>E<sub>8</sub></b>	9,8%	50%	13%	22%
<b>3x auftauen u. einfrieren</b>	50%	54%	21%	42%

### **3.1 k Ermittlung der Resistenz der HL60-Zellen gegen Ultraschall im Wasserbad, nach unterschiedlichen Inkubationszeiten**

Die Zahl der vitalen Zellen nimmt mit Zunahme der Expositionszeit im Ultraschallbad ab. Nach 20 Sekunden sind nur noch 10% der Ausgangszellen vital.

Die ausführlichen Ergebnisse befinden sich in Anhang 7.3.1 k.

### **3.1 l Optimierter ELISA**

- Es zeigte sich keine signifikante Abhängigkeit zwischen dem Anteil toter Zellen und der Extinktion in diesem Versuchsansatz.

Die ausführlichen Ergebnisse befinden sich im Anhang 7.3.1 l.

### **3.1 m Optimierter ELISA**

- Es zeigte sich keine signifikante Abhängigkeit zwischen dem Anteil toter Zellen und der Extinktion in den hier durchgeführten Versuchsansätzen.

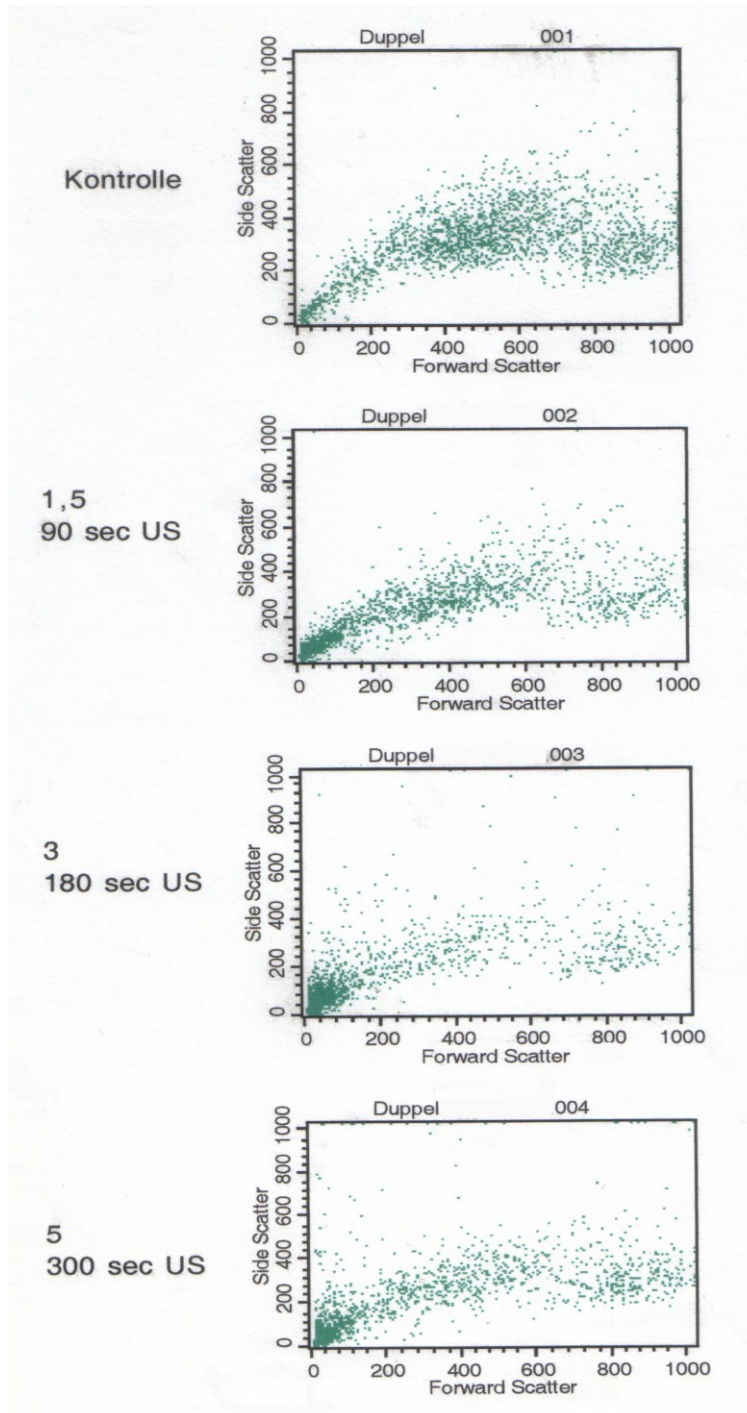
Die ausführlichen Ergebnisse befinden sich im Anhang 7.3.1 m.

### **3.1 n Erstellung einer Standardkurve unter optimierten Bedingungen**

- Es konnte keine signifikante Abhängigkeit zwischen dem Anteil toter Zellen und der Extinktion in diesem Versuch festgestellt werden.

Die ausführlichen Ergebnisse befinden sich im Anhang 7.3.1 n.

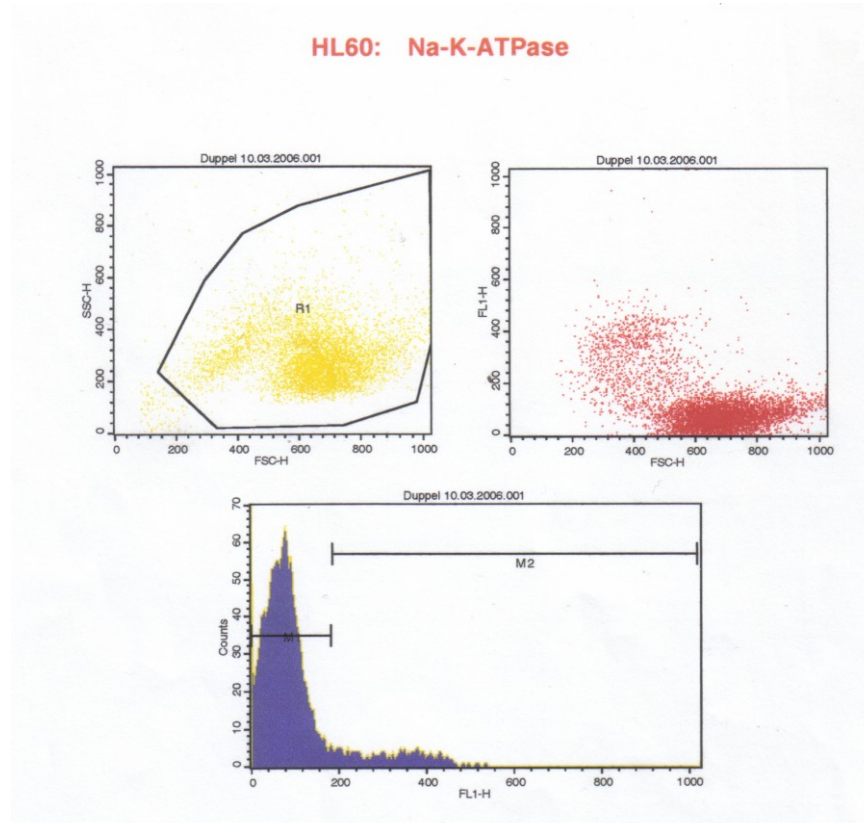
**3.1 o Bestimmung der Streulichteigenschaften von „lysierten“ HL60-Zellen mittels FACS in Abhängigkeit von der Zerstörungszeit im Ultraschallbad in Sekunden**



**Abb.10: Streulichteigenschaften der Zellbruchstücke im FACS:** Dargestellt ist die Zunahme der Zellbruchstücke bei zunehmender Zerstörungszeit der Zellen in Sekunden im Ultraschallbad. Auf der X-Achse ist die Partikelgröße und auf der Y-Achse die Granularität dargestellt.

### 3.1 p Überprüfung der erwarteten AK-Bindungen mittels FACS

Als Beispiel für die FACS-Ergebnisse sei hier stellvertretend eine Ergebnis-Abbildung gezeigt.



**Abb. 11: Überprüfung der erwarteten Antikörperbindungen im FACS.** Dargestellt sind hier beispielhaft die Streulichteigenschaften von HL60-Zellen im FACS. Es soll die spezifische Bindung zwischen den Zellbruchstücken und den verschiedenen Antikörpern getestet werden. Zur Sichtbarmachung der spezifischen Bindung wurden spezielle Fluoreszenzantikörper eingesetzt.

Die unspezifischen Bindungen zwischen dem 2. Ak gegen die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase und den Umgebungsstrukturen sind hoch und konnten nicht suffizient geblockt werden.

## 3.2 Fluoreszenzfarbstoff - Konzept

### 3.2 a Modifikation des Assays nach 2.1 durch Einführung des Farbstoffes PKH2-GL anstelle des 2. Antikörpers

- Ein qualitativer Nachweis von Zellen bzw. Zellbruchstücken ist möglich.

Eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse befindet sich im Anhang 7.3.2 a.

### **3.2 b Optimierung des PKH2-GL-Assays mit reduzierter Zellzahl**

- Der qualitative Nachweis von Zellen bzw. Zellbruchstücken ist gegenüber der Negativkontrolle auch bei reduzierter Zellzahl möglich.
- Eine längere Inkubationszeit mit dem Fluoreszenzfarbstoff bringt keine Vorteile.
- Mit der reduzierten Zellzahl wurde ebenso, wie im Versuch 3.2 a die Beobachtung gemacht, dass die Bruchstücke mehr Fluoreszenzfarbstoff binden können, als die unlysierten Zellen.

Eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse befindet sich im Anhang 7.3.2 b.

### **3.2 c Austausch von Rinderalbumin als Blocker gegen Tween 20**

- Ein Nachweis von Membranbruchstücken ist nicht möglich.

Eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse befindet sich im Anhang 7.3.2 c.

### **3.2 d Zwischenversuch zur Blockertestung. Getestet werden: kein Blocker, BSA, Tween 0,1% und Tween 0,01% sowie Ziegen-IgG.**

Mittelwerte der Extinktionen:	keine Blockung:	9,24
	BSA:	7,67
	Tween 0,01%:	8,41
	Ziegen-IgG:	7,75
	Tween 0,1%:	8,46

### **3.2 e Optimierung des Tests ohne Notwendigkeit einer Blockung von unerwünschten Bindungen**

- Ein Nachweis von Membranbruchstücken ist nicht möglich.
- Vitale Zellen können nachgewiesen werden.
- Ein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Platten ist nicht erkennbar.

Ausführliche Darstellung der Ergebnisse: siehe Anhang 7.3.2 e.

### **3.2 f Optimierung des Tests ohne Notwendigkeit einer Blockung mit höherer G-Zahl beim Zentrifugieren**

- Ein Nachweis von Membranbruchstücken ist nicht möglich.
- Vitale Zellen können nachgewiesen werden.

Eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse befindet sich im Anhang 7.3.2 f.

### **3.2 g Änderung in der Abfolge der Versuchsschritte: Es wird zuerst gefärbt und anschließend werden die HL60-Zellen lysiert.**

- Der Farbstoff leuchtet.
- Die Fluoreszenz wird nach US-Behandlung geringer
- Die Abnahme der Fluoreszenz ist nicht von der Länge der Ultraschall-Behandlung abhängig (nicht-proportional).
- Über die gebundenen Zellbruchstücke kann keine Aussage gemacht werden.
- Anders als erwartet nimmt die Zellmenge, die durch den Farbstoff markiert wurde, nicht durch den Ultraschall ab.

Die Ausführliche Darstellung der Ergebnisse befindet sich im Anhang 7.3.2 g.

### **3.2 h Resistenz der HL60-Zellen gegen destilliertes Wasser**

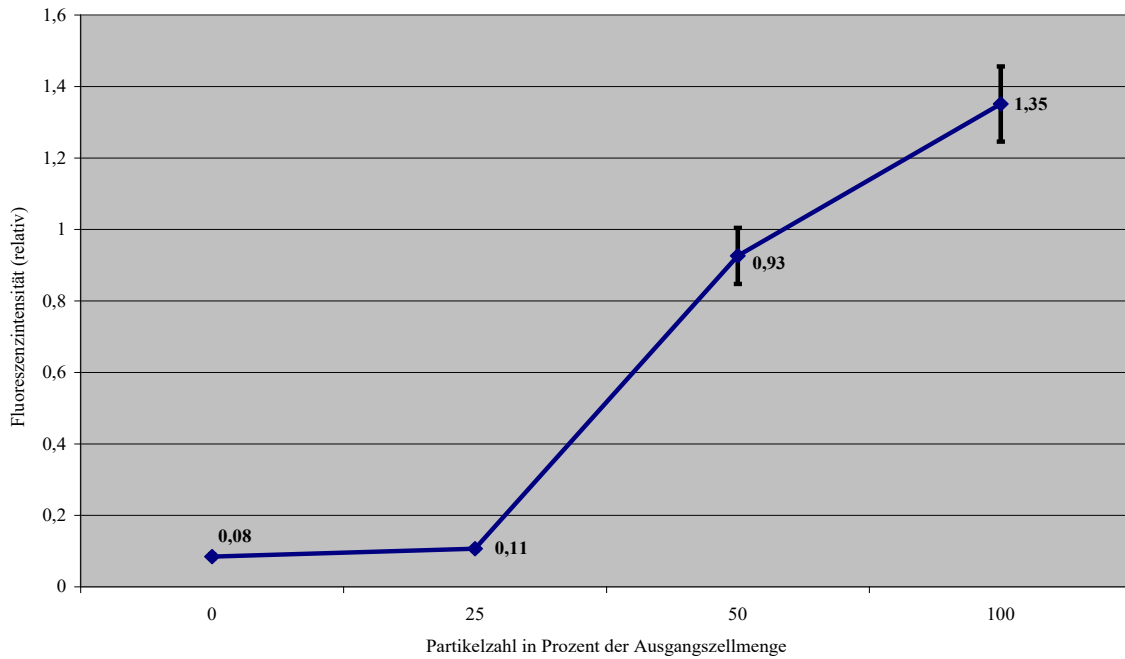
Entsprechend der eingesetzten Zellmenge konnten Bruchstücke und Zellen mittels Lebend-Tod-Färbung nachgewiesen werden.

### **3.2 i Optimierung des Ansatzes mit in destilliertem Wasser lysierten Zellen, wie unter 2.2 h beschrieben**

- Die Zellbruchstücke lassen sich quantitativ nachweisen.
- Es sind bei der Lebend-Tod-Färbung rote Schleier bei den lysierten Zellen auf dem kompletten Sichtfeld zu sehen (freie DNA).

Die ausführliche Darstellung der Ergebnisse befindet sich im Anhang 7.3.2 i.

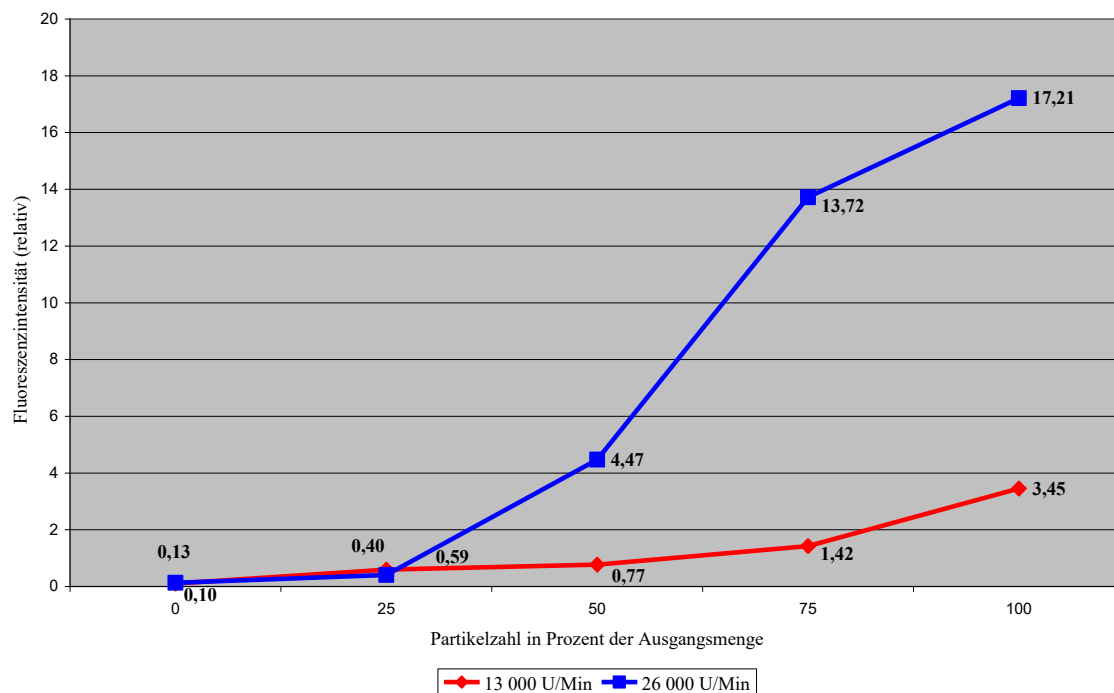
### 3.2 j Weitere Testoptimierungen, ansonsten wie unter 2.2 i beschrieben



**Abb. 12: Veränderung der Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten in Abhängigkeit von der Partikelmenge.** Dargestellt ist der Mittelwert aus je 4 Einzelmessungen. Die Messpunkte markieren die Mittelwerte plus/minus Standardabweichung. Die Ausgangszellmenge war  $1 \times 10^6$  Zellen/ml. Beobachtung: Nach 10 Minuten sind alle HL60-Zellen in Aqua dest. zerplatzt.

Die ausführliche Darstellung der Ergebnisse befindet sich im Anhang 7.3.2 j.

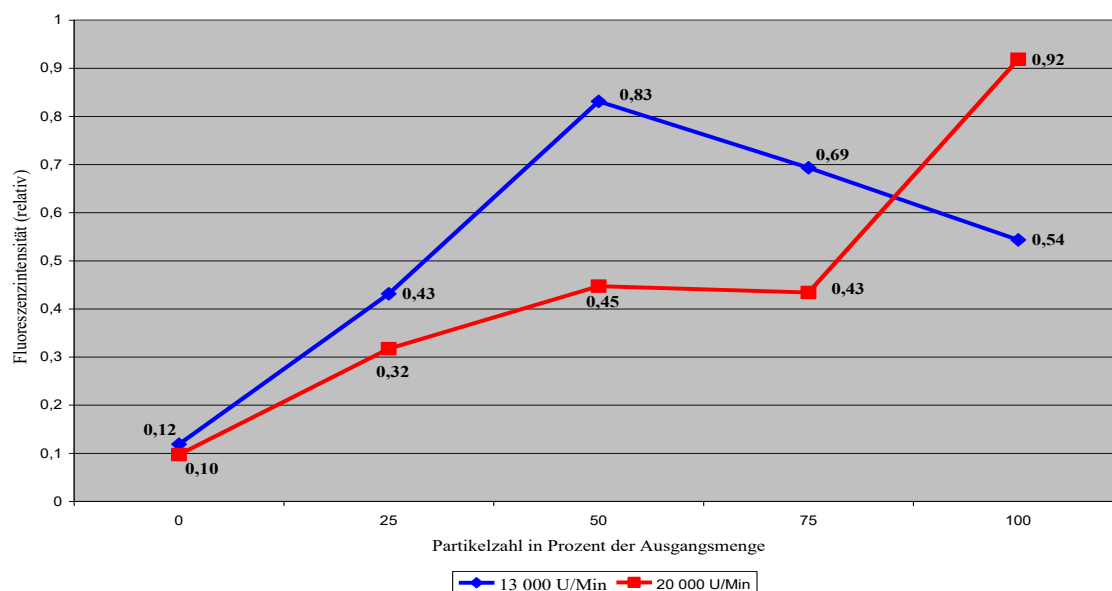
### 3.2 k Optimierung der Zentrifugation und der Farbstoffverdünnung



**Abb. 13: Veränderungen der Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten in Abhängigkeit von der Partikelmenge pro ml und der Zentrifugationsgeschwindigkeit.**

Blaue Kurve: Beckmannzentrifuge, rote Kurve: Eppendorfzentrifuge.

### 3.2 l Weitere Optimierung der Drehzahl beim Zentrifugieren zur Erhöhung der Bruchstückzahl



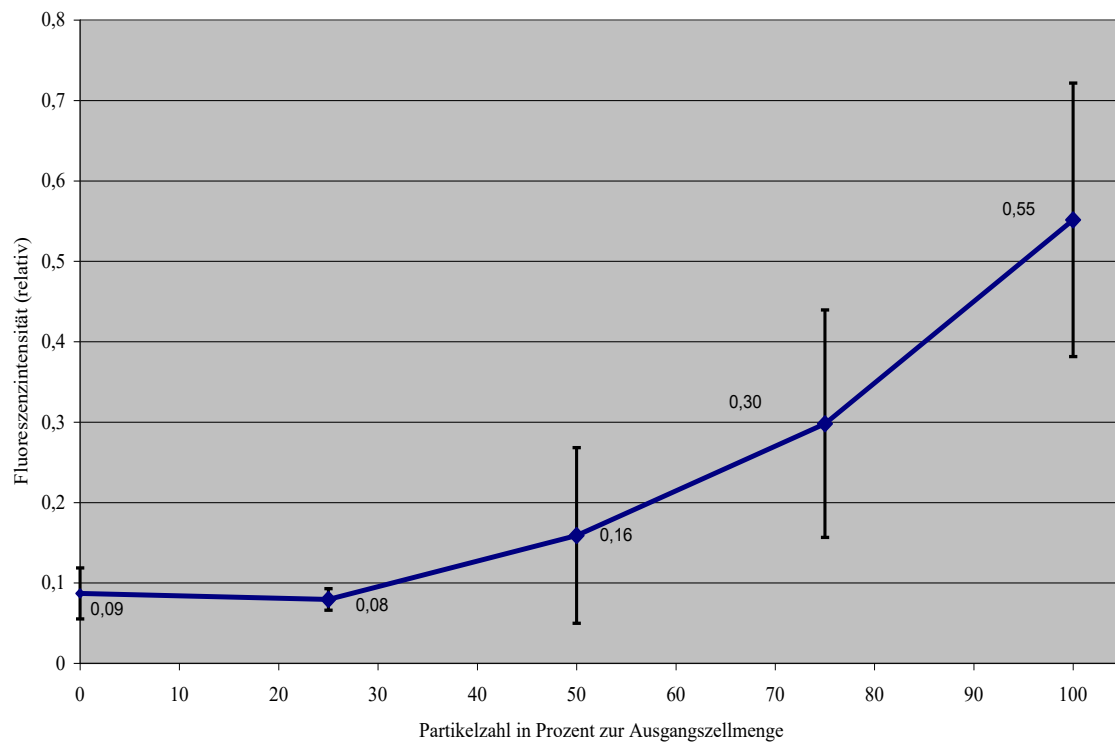
**Abb. 14: Veränderungen der Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten in Abhängigkeit von der Partikelmenge pro ml und der Zentrifugationsgeschwindigkeit,**

blaue Kurve Eppendorf-Zentrifuge, rote Kurve. Beckmann-Zentrifuge.

Die ausführliche Darstellung der Ergebnisse befindet sich im Anhang 7.3.2 l.

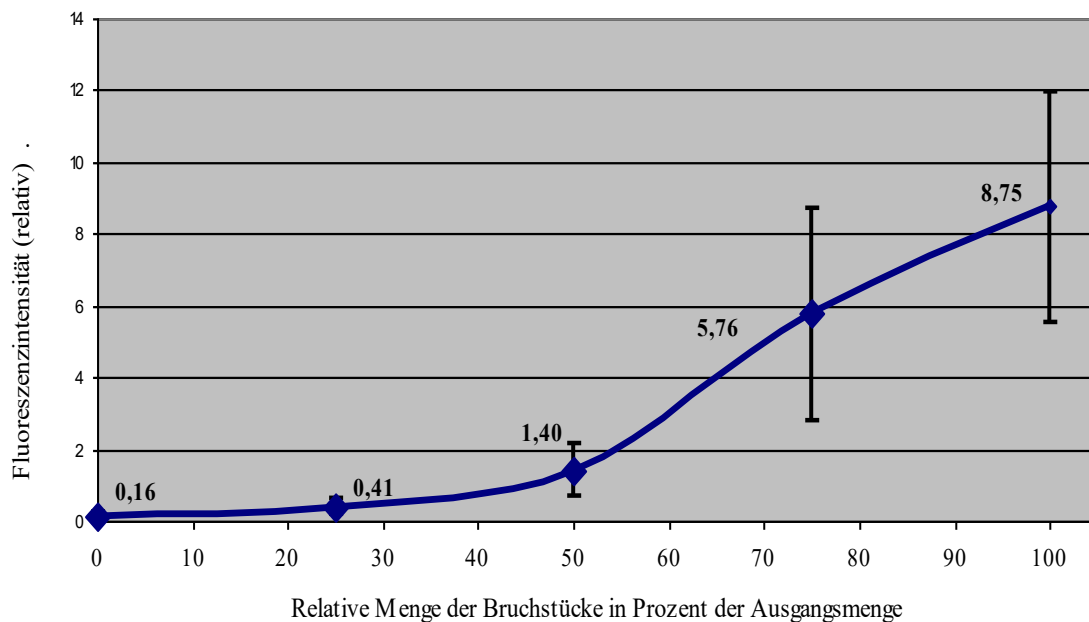


### 3.2 m Erstellung der Standardreihe mit lysierten HL-60 Zellen



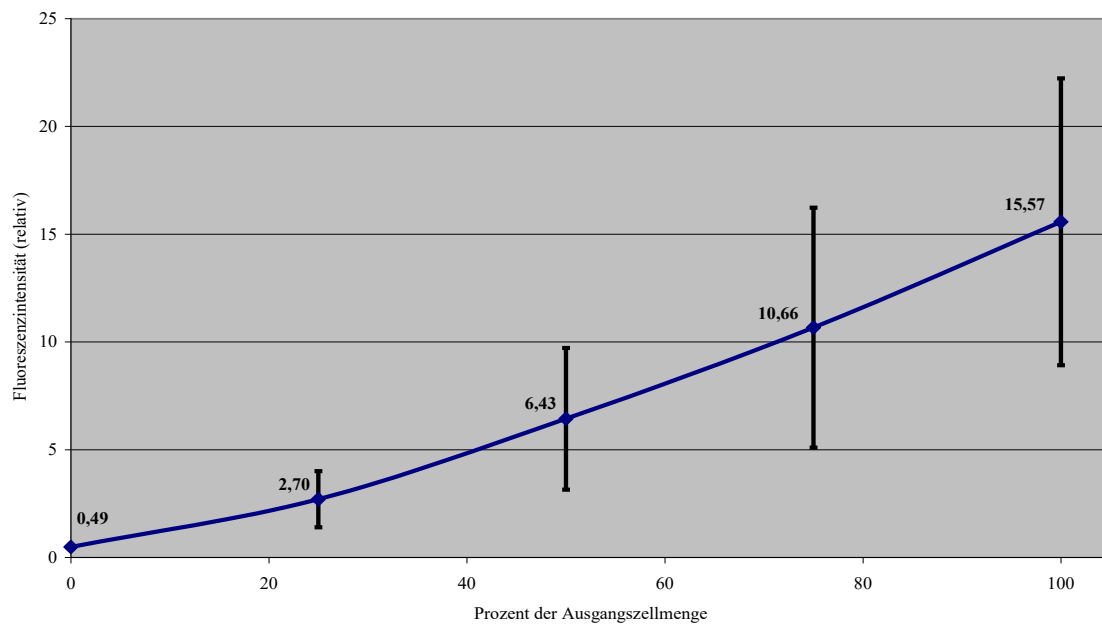
**Abb 15: Veränderung der Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten in Abhängigkeit von der Partikelmenge.** Dargestellt ist der Mittelwert aus je 12 Einzelmessungen. Die Messpunkte markieren die Mittelwerte plus/minus Standardabweichung.

Die ausführliche Darstellung der Ergebnisse befindet sich im Anhang 7.3.2 m.



**Abb. 16: Veränderungen der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Partikelmenge.** Es wurden je 12 Messungen durchgeführt. Die Messpunkte markieren die Mittelwerte plus/minus Standardabweichung.

### 3.2 n Begrenzung der Zentrifugationsgeschwindigkeit auf 15 000G

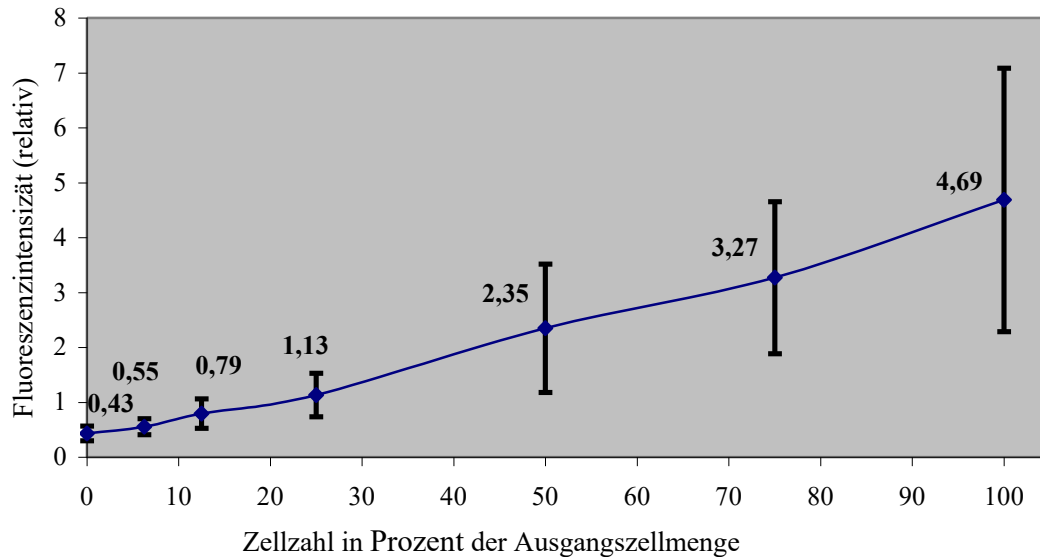


**Abb. 17: Veränderungen der Mittelwerte der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Partikelmenge**, je 56 Einzelmesswerte. Die Messpunkte markieren die Mittelwerte plus/minus Standardabweichung. Ausgangszellmenge:  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml.

Die ausführliche Darstellung der Ergebnisse befindet sich im Anhang 7.3.2 n.

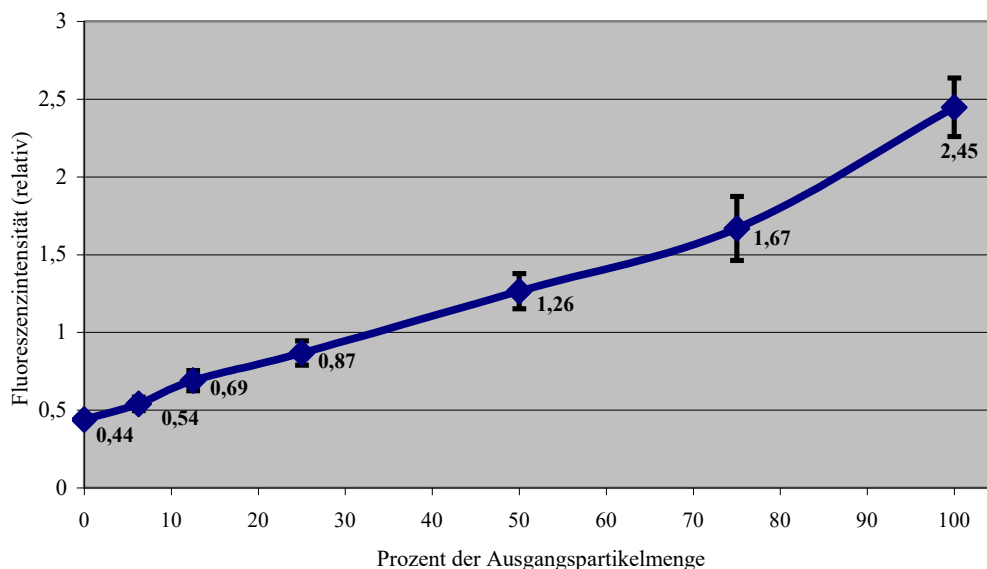
### 3.3 Standardkurvenerstellung für die PKH2-GL-basierte Methode

#### 3.3 a Erstellung einer Standardkurve mit HL60-Zellen in wässrigem Medium



**Abb. 18: Standardkurve zur Darstellung der Abhängigkeit zwischen der Zellmenge (lysierte HL-60 Zellen) und der Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten, je 14 Einzelmesswerte. Die Messpunkte markieren die Mittelwerte plus/minus Standardabweichung.**

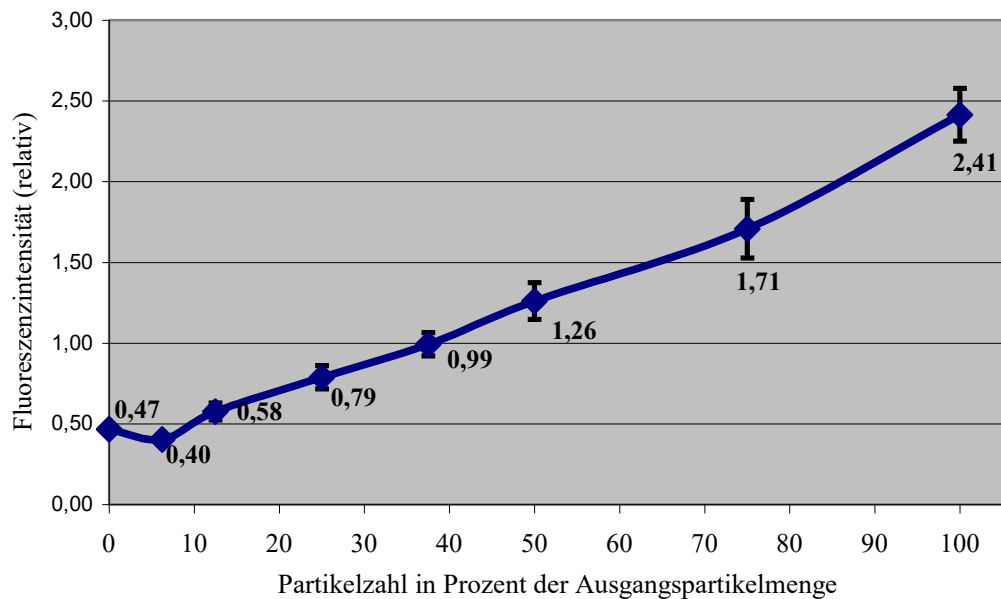
#### 3.3 b Erstellung einer Standardkurve mit PKH2-GL-beschichteten Latexkugeln in wässrigem Medium



**Abb. 19: Eichkurve: Dargestellt ist die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten von der Partikelmenge (Ausgangsmenge  $1 \times 10^7$  Partikel pro ml). Die Messpunkte markieren die Mittelwerte plus/minus Standardabweichung der je 24 Einzelmesswerte.**

Nach Spearman-Rho ist der Korrelationskoeffizient  $r = 0,987$ , mit  $p < 0,001$ .

### 3.3 c Erstellung einer Standardkurve mit PKH2-GL-beschichteten Latexkugeln in Plasma-ähnlichem Medium (Biseko)



**Abb 20: Eichkurve:** Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Latexpartikelkonzentration. Jeder Punkt besteht aus je 20 Einzelmesswerten. Plasmaähnliches Medium ist Biseko. Die Messpunkte markieren die Mittelwerte plus/minus Standardabweichung. Ausgangspartikelmenge:  $9,0 \times 10^7$  Partikel pro ml. Nach Spearman-Rho ist der Korrelationskoeffizient mit  $r = 0,978$  mit  $p < 0,001$  signifikant.

### **3.4 Messung von klinischen Proben**

#### **Probengewinnung**

Es wurden folgende Proben gewonnen:

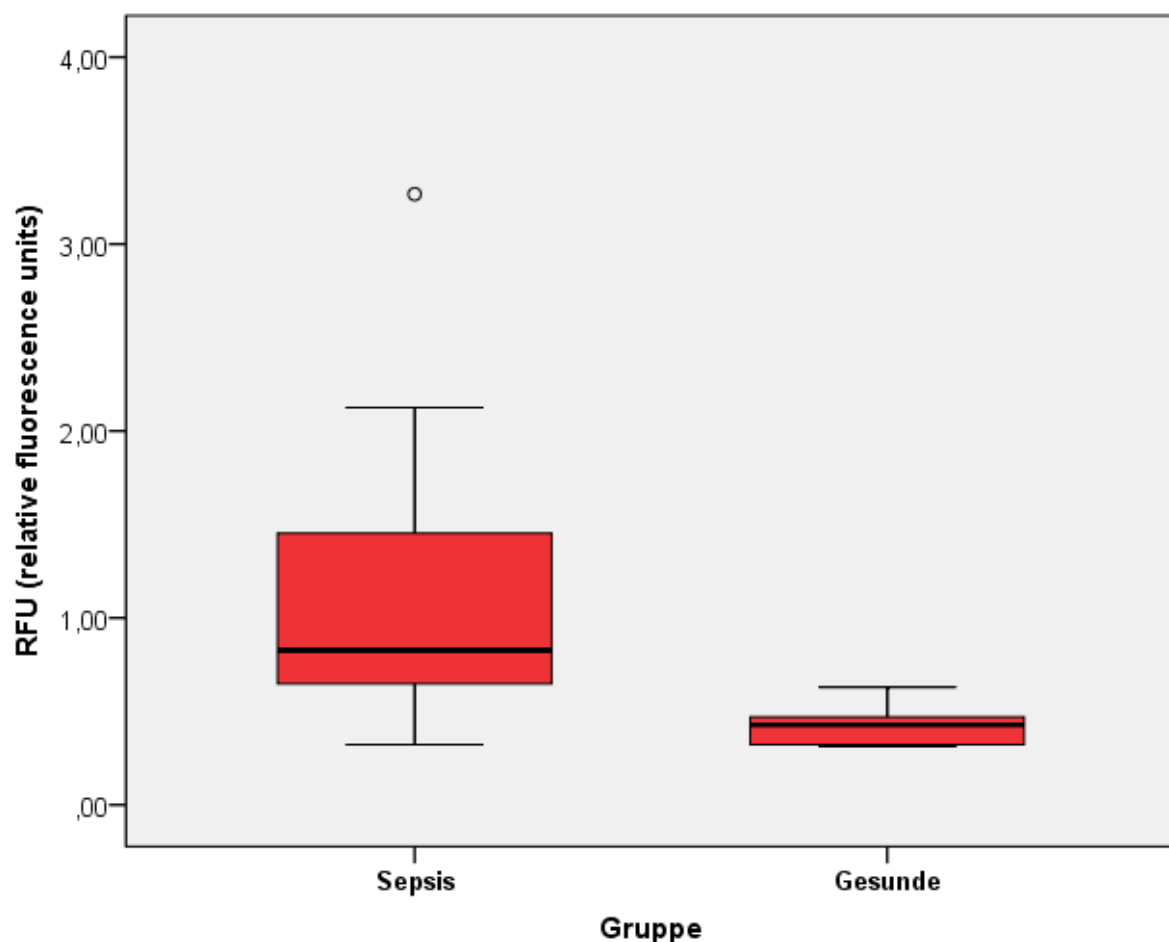
Kontrollgruppe, n = 22, mittleres Alter 40,9 Jahre, 10 weiblich, 12 männlich,  
Altersrange 18-65 Jahre.

Sepsispatienten, n= 26, mittleres Alter 64,0 Jahre, 9 weiblich, 17 männlich.  
Altersrange 39-79 Jahre.

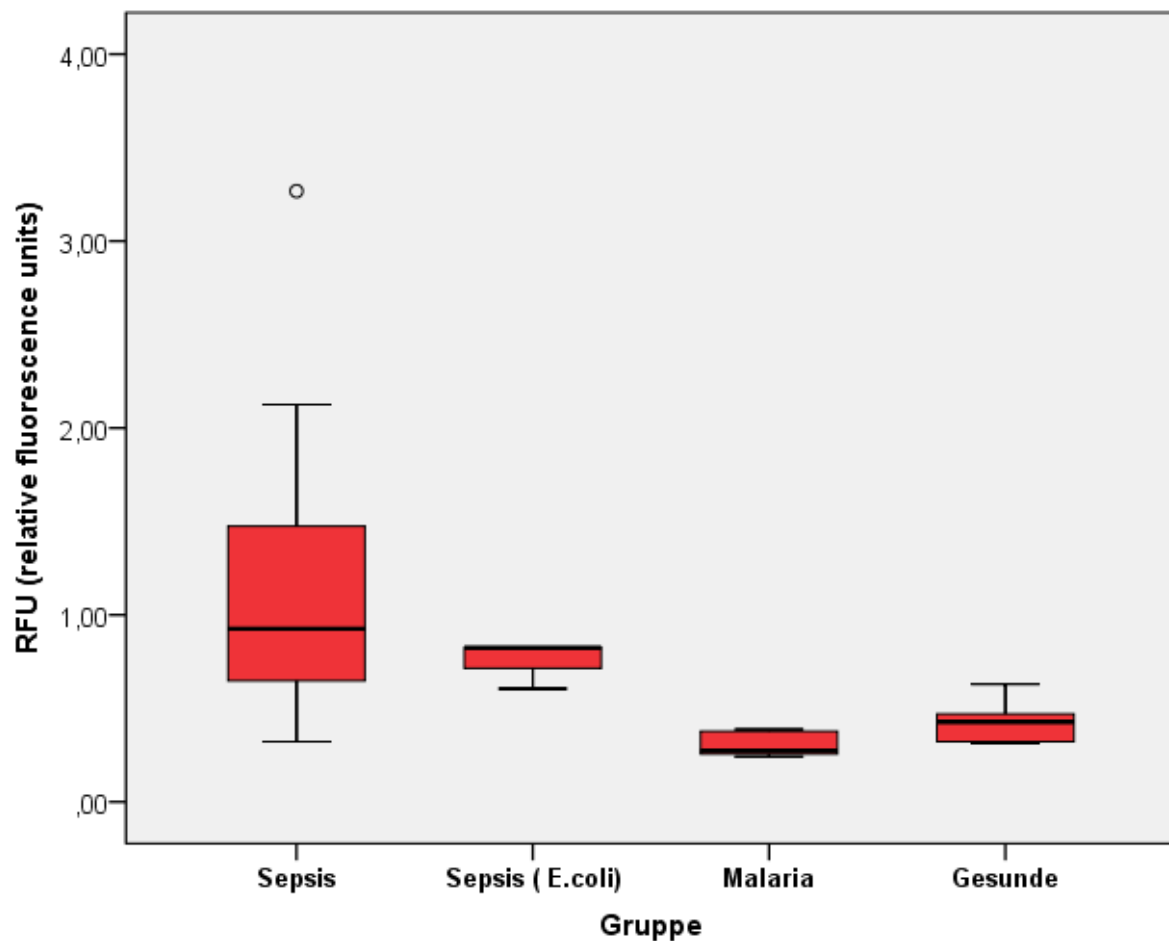
Sepsispatienten mit einer gesicherten E-coli-Sepsis, n = 3

Malaria tropica, n = 10

#### **Messung der Patientenproben**



**Abb 21: Darstellung der Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität, RFU (Y-Achse) von der Zugehörigkeit der einzelnen Gruppen.** Nach Kruskal-Wallis ergibt sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,0001$ ) zwischen den Sepsispatienten und Gesunden.



**Abb 22: Gegenüberstellung der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität (Y-Achse) von der Zugehörigkeit der einzelnen Gruppen** (Anzahl der Parallelmessungen: Sepsis 26, E.coli-Sepsis 3, Malaria 10, Gesunde 22)

Nach Kruskal-Wallis ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ( $p < 0,001$ ). Der Mann-Whitney-Test ist für:

Gesunde versus Sepsis:	$p < 0,001$ ,
Gesunde versus E.coli-Sepsis:	$p < 0,001$
Gesunde versus Malaria:	$p < 0,001$ ,
Sepsis versus E.coli-Sepsis:	$p < 0,464$ ,
Sepsis und Malaria:	$p < 0,001$ ,
E.coli-Sepsis versus Malaria:	$p < 0,001$ .

## 4. Diskussion

Sepsis ist eine unterdiagnostizierte Erkrankung mit einer unverändert hohen Letalität, welche neue Diagnostikkonzepte erfordert. Insbesondere in der Spätphase der Sepsis kann eine deutlich erhöhte Rate positiver Blutkulturen als Zeichen eines Versagens des angeborenen Immunsystems nachgewiesen werden (79). Für diesen oft als Immunparalyse bezeichneten Zustand fehlt es an diagnostischen Werkzeugen zum Monitoring und an weiteren Therapieansätzen, um das Immunsystem wieder herzustellen. Neben dem oben genannten HLA-DR der Monozyten, welches deren Aktivitätszustand beschreibt, scheint die quantitative Messung der Gesamt-Mikropartikel im Plasma eine interessante Größe, um die zelluläre Abräumfunktion einzuschätzen. Mikropartikel von einem bestimmten Ursprungsort (z.B. der Endothelzelle) sind bereits beschrieben (siehe Einleitung). Hier soll erstmalig die Gesamtheit der Mikropartikel unabhängig vom Entstehungsort gemessen werden. In dieser Arbeit wurden verschiedene Messkonzepte mittels ELISA und Fluoreszenzfarbstoffen untersucht. Für das ELISA-Konzept sprach zunächst, dass es mehrere Zielstrukturen auf den Zelloberflächen gibt, die für diesen Assay in Frage kommen. Für das Farbstoffkonzept sprachen die schnellere Durchführbarkeit eines einzelnen Ablaufes und die geringere Störanfälligkeit gegenüber Fremdsubstanzen. Dies ermöglicht den praktischen Einsatz in der Diagnostik. Nachfolgend werden die einzelnen Experimentalabschnitte der ELISA- und Farbstoffmessungen diskutiert.

### **4.1 ELISA - Konzept**

#### **4.1 a ELISA zum Nachweis von Zellbruchstücken mit Annexin V als Rezeptor für PS und einem AK gegen die $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase- $\alpha_1$**

Die gemessenen Extinktionswerte zeigten für die unterschiedlichen Zellbruchstückmengen keine signifikant unterschiedlichen Messwerte. Damit war eine quantitative Messung von Bruchstücken der C3A-Zellen nicht möglich. Da dieser Versuchsaufbau nicht erfolgreich war, wurden folgende Veränderungen geplant: Das Detergenz Tween soll durch PBS-Ca ausgetauscht werden, um eine zelllytische Eigenschaft von Tween zu vermeiden, was die Bruchstückmenge verfälschen würde.

Desweiteren soll ein anderer  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase-AK eingesetzt werden, der auch weitere Isoformen der  $\alpha$ -Untereinheiten erkennt. Zudem ist die  $\alpha_1$ -Untereinheit insbesondere auf Leberzellen sehr schwach ausgebildet (11). Daher sollen auch die Versuchszellen gewechselt werden. HL60, eine humane Leukozyten-Zelllinie erschien als geeigneter. Da die Leukozyten-Zelllinie ohne FCS (fetales Kälberserum) kultiviert wird, könnte somit ein weiterer potentieller Störfaktor entfallen. Da die Blockung unzureichend war, wird in den weiteren Versuchen Ziegenserum als Blocker verwendet werden. Der pH-Wert sollte regelmäßig bestimmt werden, besonders bei bikarbonatreichen Substanzen, die sich als sogenannte offene Puffersysteme durch den  $\text{CO}_2$ -Austausch über die Raumluft verändern.

#### **4.1 b ELISA zum Nachweis von Zellbruchstücken unter Einsatz eines anderen AK gegen $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase- $\alpha$ und Einsatz von HL60 Zellen**

Trotz des Austausches der Versuchszellen und eines Antikörpers, lässt sich keine von der Zellbruchstückmenge abhängige Extinktion nachweisen. Da die Extinktionen in den Versuchsansätzen mit und ohne Zellen identisch waren, ist in Frage zu stellen, ob hier überhaupt Zellbruchstücke vorhanden waren. Unter dem Mikroskop ließen sich kaum Bruchstücke nachweisen. Des Weiteren waren weder die spezifischen Bindungen zwischen Zellbruchstücken und Antikörpern gesichert noch konnten unspezifische Bindungen ausgeschlossen werden. Daher sollten verschiedene Substanzen als "Blocker" gegen die unspezifischen Bindungen getestet werden.

#### **4.1 c Austestung verschiedener Blocker: Rinderalbumin (BSA), Ziegenserum und Ziegen IgG**

Es ließ sich feststellen, dass mit steigender Blockerkonzentration die Extinktion und damit die Bindung der Antikörper an das Material des Gefäßes und andere unspezifische Bindungen abnehmen. Dies stellt einen erwünschten Effekt dar – dieser sollte allerdings viel ausgeprägter sein. Darüber hinaus war die Extinktion ohne ersten Antikörper höher als mit diesem. Dies lässt den Schluss zu, dass der erste Antikörper unspezifische Bindungen besetzt, an die sonst der zweite Antikörper unspezifisch binden würde. Die Extinktionswerte schwanken erheblich innerhalb eines Versuchsansatzes. Es zeichnete sich keine Tendenz ab, welcher der Blocker effektiver



wirkt. Zusätzlich wurde eine zweite Messung bei 405 nm durchgeführt, um festzustellen, ob die Stopplösung die Farbreaktion beendet. Die Extinktionswerte änderten sich teilweise nach Zugabe der Stopplösung noch um 30 Einheiten. Daher erfolgte die Hemmung der Farbstoffreaktion nicht vollständig. Kontaminationen konnten weitestgehend ausgeschlossen werden, da auf sauberes Pipettieren geachtet wurde. Zudem wurde das Photometer auf 37°C aufgewärmt, um eine ideale Reaktionstemperatur zu haben. Die Blocker erfüllten ihre Funktion nicht und ein weiteres Vorgehen mit diesen Blockern in Kombination mit diesen Antikörpern erschien nicht sinnvoll. Als nachfolgender Schritt wurde ein Austausch der Mikrotiterplatte geplant, um den Einfluss der Platte durch deren Eigenfluoreszenz auf die Extinktion zu reduzieren.

#### **4.1 d Überprüfung der unspezifischen Bindungen im ELISA durch einen Versuchsansatz mit und ohne Zellen und Tween als neuem Blocker**

Der Blocker Tween erfüllt seine Aufgabe, unspezifische Bindungen zu blockieren, für den 3. AK, ist aber in seiner Wirkung unzureichend, da er ohne Zellen mehr Bindungen aufweist, als mit Zellen. Weitere Versuche sind notwendig, um die unspezifischen Bindungen näher eingrenzen zu können.

#### **4.1 e Überprüfung weiterer unspezifischer Bindungen zwischen dem 1. und 3. sowie dem 2. und 3. Antikörper**

AK 2 scheint eine hohe unspezifische Bindungsstärke aufzuweisen und muss suffizienter geblockt oder ersetzt werden. AK 3 weist keine unspezifischen Bindungen auf und liefert in diesem Zwischenversuch ein akzeptables Ergebnis.

#### **4.1 f Optimierung der verschiedenen Blockerkonzentrationen von BSA und Ermittlung der besten Inkubationszeit**

Das neu eingesetzte Rinderalbumin (BSA) schien in der Konzentration von 0,5% am besten geeignet zu sein. Außerdem brachte eine zusätzliche Gabe von Tween zu BSA keine Erhöhung der Blockerwirkung. Sechsmaliges Waschen zeigte nicht mehr Effekt

als dreimaliges. Eine längere Blockungszeit brachte keine Vorteile. Somit wurde mit BSA 0,5 % weitergearbeitet.

#### **4.1 g ELISA mit optimierten Konzentrationen, Blockern und Inkubationszeiten**

Das Wachstumsmedium der Zellen schien mit den AK zu reagieren, da die Extinktionswerte ohne den 1. AK höher waren als mit diesem. Daher wurden in weiteren Versuchen die Zellen gewaschen, um sie vom Wachstumsmedium zu befreien. Desweiteren soll der Farbstoffpuffer 1:1 verdünnt werden, denn es waren noch ausreichend hohe Extinktionswerte zu erwarten. Die Optimierung des ELISAs funktionierte, da die Extinktion mit steigender Probenverdünnung sank.

#### **4.1 h Einfluss von Tween auf die Zellmembran und damit die Vitalität der HL60-Zellen**

Die Vitalität der HL60-Zellen nahm um bis zu 10% nach Tween-Exposition ab. Die Zelltoxizität war größer erwartet worden.

#### **4.1 i Optimierter ELISA mit vorherigem Waschen der Zellen**

Das Waschen der Zellen verminderte die unspezifischen Bindungen. In dem Kontrollansatz band das Nährmedium hochgradig unspezifisch. Tween schien bei den gewaschenen Zellen die unspezifischen Bindungen zu verstärken. Hier sind weitere Zwischenversuche nötig. Die Blockung soll in Zukunft mit Rinderalbumin (BSA) durchgeführt werden.

#### **4.1 j Prüfung der mechanischen Resistenz von differenzierten und undifferenzierten Zellen durch verschiedene Chemikalien bzw. Temperatur.**

Differenzierte Zellen scheinen das dreimalige Auftauen und Einfrieren besser zu vertragen als undifferenzierte Zellen. Wohingegen höhere Konzentrationen der Detergenzien die differenzierten Zellen mehr zu schädigen scheinen als die undifferenzierten. Zudem scheint Tween mehr Zellen zu zerstören als C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>.

Da das Auszählen in der Neubauer-Zählkammer einige Minuten in Anspruch nahm, waren die Zellen unterschiedlich lange Zeiten den Detergenzien ausgesetzt. Die hier gewonnenen Ergebnisse sind mit denen der Vorversuche kaum vergleichbar.

#### **4.1 k Ermittlung der Resistenz der HL60-Zellen gegen Ultraschall im Wasserbad nach unterschiedlichen Inkubationszeiten**

Der gepulste Ultraschall war sehr wirksam. Nach einer Minute Expositionszeit waren 95% der Zellen lysiert. Die Zerstörung nahm erwartungsgemäß mit der Expositionszeit zu. Daher wurde für Folgeexperimente eine Ultraschallexposition von mehr als 60 Sekunden umgesetzt, um einen vollständigen Zellaufschluss zu ermöglichen.

#### **4.1 l Optimierter ELISA - Vorversuch**

Die Positivkontrolle zeigte ein Signal, somit waren Enzym und Farbstoff funktionsfähig. Die übrigen Messwerte waren nicht von der Negativkontrolle (ohne Bruchstücke) verschieden, so dass keine Aussage zu der Menge der Bruchstücke gemacht werden konnte. Eine spezifische Bindung scheint nicht stattgefunden zu haben. Das Versuchsergebnis deckte sich nicht mit den Ergebnissen von 3.1 i und musste unverändert wiederholt werden. Der Fehler entstand vermutlich bei der Ansetzung der Antikörperlösung, jedoch lässt sich die Ursache im Nachhinein nicht mehr zweifelsfrei nachweisen.

#### **4.1 m Optimierter ELISA**

Die Ergebnisse dieses Versuches deckten sich mit denen von Versuch 3.1 l: Es war kein quantitativer Nachweis von Zellbruchstücken möglich. Unter dem Mikroskop ließen sich deutlich weniger Membranbruchstücke nachweisen als erwartet. Denkbare Ursachen für die Abnahme der Membranbruchstücke könnten sein, dass diese beim Waschen abhanden gekommen sind. Zudem bestünde die Möglichkeit, dass die Ultraschallintensität zur Zerstörung der Zellen zu groß war. Ein weiterer möglicher Grund für die geringe Anzahl an Membranbruchstücken könnte eine Unspezifität des Antikörpers sein. Von einem funktionierenden ELISA konnte zu dem Zeitpunkt nicht gesprochen werden. Als Zwischenstand konnte zusammengefasst werden, dass zur

Reduktion von unspezifischen Bindungen die Zellen bei zukünftigen Experimenten vor dem Aufschluss gewaschen werden sollen und die Anzahl der Waschschrirte von eins auf drei erhöht werden soll.

#### **4.1 n Erstellung einer Standardkurve mit den zuvor gewonnen Erkenntnissen**

Aufgrund der Positivkontrolle konnte festgestellt werden, dass das Enzym und der Farbstoff funktional waren. Die übrigen Werte waren alle von der Negativkontrolle verschieden, aber unterschieden sich selbst nicht voneinander. Damit konnte keine quantitative Bestimmung der Partikelmenge mittels des Assays erfolgen. Ob der 2. und 3. Antikörper spezifisch binden, musste erneut in Frage gestellt werden.

Bei weiteren Versuchen sollte die spezifische Bindung des 2. und 3. Antikörpers nachgewiesen werden. Für den Nachweis der Bindung bot sich die Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS) an. Zusätzlich war auch daran zu denken, dass das verwendete Enzym keine ausreichende Aktivität vorwies, da das Verfallsdatum schon recht lange überschritten wurde, andererseits zeigte die Positivkontrolle ein Signal, sodass nicht von einem vollständigen Wirkverlust zu sprechen ist.

#### **4.1 o Bestimmung der Streulichteigenschaften von lysierten HL60-Zellen mittels FACS in Abhängigkeit von der Zerstörungszeit im Ultraschallbad**

Der erste Antikörper erfüllte die Erwartungen, band spezifisch an die HL60-Bruchstücke und konnte mittels Fluoreszenzfarbstoff nachgewiesen werden. Für den 2. Antikörper konnte keine ausreichende Bindung nachgewiesen werden, obwohl die Bruchstücke vorhanden und im FACS indirekt sichtbar waren.

#### **4.1 p Überprüfung der erwarteten AK-Bindungen mittels FACS**

Für den zweiten Antikörper konnte keine ausreichende Bindung an die HL60-Bruchstücke nachgewiesen werden. Da die Bruchstücke in der FACS-Analyse detektierbar waren, ließ sich schlussfolgern, dass der zweite Antikörper nicht spezifisch band und auszutauschen war.

Insgesamt lieferte das ELISA-Konzept keine zufriedenstellenden Ergebnisse, so dass ein zweites Konzept notwendig war.

## **4.2 Fluoreszenzfarbstoff - Konzept**

### **4.2 a Testung von PKH2-GL, einem grünleuchtenden ampholytären Fluoreszenzfarbstoff**

Nachdem der zweite Antikörper keine ausreichende Bindung an die HL60-Zellen aufwies, wurde er gegen den Fluoreszenzfarbstoff PKH2-GL ausgetauscht. In den nachfolgenden Messungen wurden ganze Zellen und lysierte Zellen mittels des ersten Antikörpers und des Farbstoffs PKH2-GL nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigten, dass die gemessene Fluoreszenzintensität für die Bruchstücke höher war als für die kompletten Zellen. Gründe hierfür könnten sein, dass die ganzen Zellen die Fluoreszenz etwas abschwächen, indem sie die Leuchtkraft abschirmen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Bruchstücke mehr Bindungsstellen für den Fluoreszenzfarbstoff aufweisen als die unlysierten Zellen. Daher wurde für nachfolgende Versuche die Zellzahl vermindert, um die schon nach kurzer Zeit einsetzende Klumpenbildung bei Luftexposition zu verringern. Des Weiteren wurde geplant, die Zellen im nachfolgenden Versuch parallel zum eigentlichen Versuchsansatz unter dem Mikroskop zu beobachten, um das Verhalten der Bruchstücke und Zellen beurteilen zu können.

### **4.2 b Optimierung des PKH2-GL-Assays mit reduzierter Zellzahl**

Auffällig war, dass der Fluoreszenzfarbstoff PKH2-GL gut an den Blocker Albumin bindet und damit zu unspezifischen Bindungen beiträgt. Albumin wurde folglich für die nachfolgenden Versuchsreihen ersetzt.

### **4.2 c Austausch von Rinderalbumin als Blocker gegen Tween 20**

Nach dem Austausch von Albumin gegen Tween, war die Anzahl der unspezifischen Bindungen geringer und damit die Fluoreszenzintensität ebenfalls. Die Fluoreszenzintensität war ohne Zellbruchstücke höher als mit. Daher war von weiteren

unspezifischen Bindungen auszugehen. Vermutlich band PKH2-GL an die Gefäßwand des Versuchsgefäßes.

#### **4.2 d Zwischenversuch zur Blockertestung**

In diesem Ansatz wurden BSA, Tween in verschiedenen Konzentrationen und Ziegen-IgG getestet. Alle Blocker führten zu einer Reduktion der unspezifischen Bindungen. BSA zeigte die besten Ergebnisse und sollte bei den weiteren Versuchen weiter eingesetzt werden. Insgesamt wurde eine bessere Blockungswirkung erwartet. Trotz der verschiedenen Blockungen kam es zu unspezifischen Bindungen durch den Farbstoff PKH2-GL an die 96-Well-Platte. Zellen kamen bei diesem Zwischenversuch nicht zum Einsatz.

#### **4.2 e Optimierung des Tests ohne Notwendigkeit einer Blockung von unerwünschten Bindungen**

Da die unspezifische Bindung des Farbstoffs PKH2-GL ein erhebliches Problem darstellte, soll dieses nun umgangen werden, indem die erste Reaktion nicht im Versuchsgefäß stattfindet, sondern in einem weiteren Gefäß, welches dann verworfen wird. Mit diesen Schritten konnte die unspezifische Bindung umgangen werden. Parallel wurden eine 96-Well-Platte mit glatter Oberfläche (glänzend) und mit einer rauhen Oberfläche (matt) verglichen. Bei der matten Well-Platte war die Eigenfluoreszenz geringer und der Messbereich größer. Es konnte festgestellt werden, dass sich die kompletten Zellen gut nachweisen ließen, die Bruchstücke nach dem Waschen allerdings nicht. Vermutlich sind die Bruchstücke bei den Waschschritten durch zu geringe Umdrehungszahl beim Zentrifugieren verloren gegangen.

#### **4.2 f Optimierung des Tests ohne Notwendigkeit einer Blockung mit höherer G-Zahl beim Zentrifugieren**

Die Zentrifugation wurde beschleunigt auf 15000 G für 10 Minuten. Trotzdem konnten die kleinen Bruchstücke nach 3 Waschschritten nicht mehr nachgewiesen werden, was unter dem Lichtmikroskop überprüft wurde. Im Gegensatz dazu wurden

die kompletten Zellen problemlos detektiert und waren unter dem Lichtmikroskop sichtbar.

#### **4.2 g Änderung in der Abfolge der Versuchsschritte: Es wurde zuerst gefärbt und anschließend wurden die HL60-Zellen lysiert**

In diesem Versuch wurden die Zellen und Zellbruchstücke zuerst angefärbt und dann lysiert und gewaschen. Es soll gleichzeitig überprüft werden, ob die Länge der Ultraschallexposition dem Fluoreszenzfarbstoff schadet. Als Ergebnis stellte sich folgendes heraus: Die Fluoreszenzintensität nahm nach der Ultraschallbehandlung ab, auch wenn diese nicht von der Länge der Ultraschallbehandlung abhing. Die Zellmenge, die durch den PKH2-GL-Farbstoff markiert war, nahm allerdings nicht ab. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität aufgrund der Ultraschallbehandlung war somit im Kontext des Assays tolerierbar.

#### **4.2 h Resistenz der HL60-Zellen gegen destilliertes Wasser**

Der Zerstörungsmechanismus wurde geändert: Die HL60-Zellen wurden in destilliertes Wasser gegeben, worauf diese zerplatzen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die lysierten Zellen mittels einer Lebend-Tod-Färbung beobachtet. Es wurde vermutet, dass das Nährmedium die Zellen vor dem Zerplatzen schützt.

#### **4.2 i Optimierung des Ansatzes mit in destilliertem Wasser lysierten Zellen**

Die Zellen werden bei dem Versuchsansatz durch destilliertes Wasser lysiert. In den Ergebnissen lässt sich die Menge der Bruchstücke quantitativ ablesen. Insgesamt schienen aber die Bruchstücke oder ein großer Teil davon beim Waschen zu verschwinden.

#### **4.2 j Wiederholung des Versuches 2.2 i mit optimiertem Ansatz**

Mit optimierten Bedingungen aus dem Vorversuch wurde dieser Versuch durchgeführt. Dadurch konnten Mengenverhältnisse in der Fluoreszenzintensität abgelesen werden. Zudem waren die Bruchstücke unter dem Fluoreszenzmikroskop gut sichtbar. Zügiges Arbeiten war unabdingbar, da der Farbstoff eine kurze

Halbwertszeit hat. In den nächsten Versuchsansätzen wurde beabsichtigt, die Farbstoffverdünnung zu optimieren und gegebenenfalls auch die Drehzahl der Zentrifugation nochmals anzupassen. Darüber hinaus ließ sich feststellen, dass für eine Standardkurve noch mehr Verdünnungsschritte notwendig waren.

Außerdem wurde geplant, die Ansatzmenge zur Materialersparnis bei den nachfolgenden Versuchsreihen zu halbieren.

#### **4.2 k Optimierung der Zentrifugation und der Farbstoffverdünnung**

Die Zentrifugationsgeschwindigkeit wurde auf 12000 G erhöht und der Farbstoff weiter verdünnt, um im Messbereich des Fluorometers zu bleiben. Es konnten quantitative Bruchstückmengen mittels Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden. Für die Erstellung einer Standardkurve waren mehrere Parallelmessungen notwendig.

##### **4.2 l Weitere Optimierung der Drehzahl beim Zentrifugieren zur Erhöhung der Bruchstückzahl**

Der Farbstoff wurde weiter verdünnt, da der obere Messbereich des Fluorometers erreicht worden war. Die Drehzahl wurde auf 14000 G erhöht. Die Fluoreszenzintensitäten tendierten zu einem linearen Zusammenhang mit der Konzentration der Bruchstücke. Um eine lineare Abhängigkeit zu bestätigen, wären allerdings eine größere Anzahl an unabhängigen Messungen und mehr Verdünnungsschritte notwendig gewesen.

##### **4.2 m Erstellung der Standardreihe mit lysierten HL-60 Zellen**

Eine Standardreihe sollte erstellt werden. Leider zerbarsten bei 17000 G einige Versuchsgefäße und die Pellets waren so fest, dass sie sich kaum noch auflösen ließen. Daher war die Drehzahl auf 15000 G abzusenken. Trotz der zum Teil schwer zu resuspendierenden Pellets und trotz der resultierenden Reduktion der Anzahl der Standards, zeigte die Standardreihe die Tendenz eines linearen Zusammenhangs zwischen Verdünnungen und Signalintensität. Im nächsten Ansatz sollte eine Standardreihe aufgestellt werden.



#### **4.2 n Begrenzung der Zentrifugation auf 15000G**

Es konnte eine Standardreihe aufgestellt werden, in der die optimierten Versuchsbedingungen der Vorversuche Eingang fanden. Die gemessenen sechs Einzelwerte in 20 Parallelansätzen an unterschiedlichen Tagen konnten hier einen quantitativen Nachweis von unterschiedlichen Bruchstückmengen liefern. Die Vorversuche waren hiermit abgeschlossen und es konnten die Standardreihen ohne Änderungen im Versuchsaufbau durchgeführt werden.

### **4.3 Standardkurvenerstellung für die PKH2-GL-basierte Methode**

#### **4.3 a Erstellung einer Standardkurve mit HL60-Zellen**

Die Bruchstückmengen konnten quantitativ gemessen werden. Nach Spearman-Rho waren mit  $p < 0,001$  die Ergebnisse signifikant unterschiedlich.

Es zeigten sich relativ große Standardabweichungen, deren Ursache nicht eindeutig zu benennen ist. Neben unsauberem Pipettieren ist vor allem die unterschiedliche Zellgröße der HL60-Zellen zu erwähnen. Teilweise waren hier Größenunterschiede bis zu 100% zwischen einzelnen Kulturansätzen zu verzeichnen. Bei identischen Nahrungs- und Wachstumsbedingungen könnten z.B. die Häufigkeit des Anspringens der Brutschränke inklusive Vibrationen das Wachstum der Zellen beeinflusst haben. Mit 14 Parallelmessungen an unterschiedlichen Tagen mit unterschiedlichen Versuchsansätzen ist dies bei lebenden Zellen eine normale Variationsbreite. Um die Belastbarkeit des Tests zu erhöhen sollen größennormierte Partikel zum Einsatz kommen.

#### **4.3 b Erstellung einer Standardkurve mit PKH2-GL-beschichteten Latexkugeln in wässrigem Medium**

Um schärfer abgrenzbare Ergebnisse und kleinere Standardabweichungen zu erhalten, wurden  $2\mu\text{m}$  große Latexpartikel mit PKH2-GL beschichtet und wiederum eine Standardkurve ermittelt. Nach Spearman-Rho waren die Unterschiede mit  $p < 0,001$  signifikant.

Auch wenn größennormierte Partikel völlig unphysiologisch sind, bringen sie die geforderte Trennschärfe in die Standardkurve (85). Ein Problem stellte die gleichmäßige Verteilung im verwendeten wässrigen Medium dar, da hier die runden und glatten Latexpartikel schnell absinken und sich damit im wässrigen Medium ungleich verteilen. Ständiges Schütteln des Medium war erforderlich. Um mit dem simulierten Versuchsaufbau näher an eine *in-vivo*-Realsituation heranzukommen, wird im Folgeversuch Biseko<sup>®</sup>, eine plasmaähnliche Proteinlösung, als Grundlösung eingesetzt.

#### **4.3 c Erstellung einer Standardkurve mit PKH2-GL-beschichteten Latexkugeln in Plasma-ähnlichem Medium (Biseko<sup>®</sup>)**

Im plasmaähnlichen Biseko<sup>®</sup> waren nach Spearman-Rho die Unterschiede mit  $p < 0,001$  signifikant. Mit der plasmaähnlichen Proteinlösung Biseko<sup>®</sup> wurden physiologischere Grundvoraussetzungen für die Untersuchung simuliert. Mit 20 parallel gemessenen Ansätzen an verschiedenen Tagen stellte diese Standardkurve eine gute Voraussetzung für Messungen von humanen Plasmaproben dar.

### **4.4 Messung von klinischen Proben**

#### **Probengewinnung**

Die in den Vorversuchen gewonnenen Erkenntnisse zur Bestimmung der Mikropartikel sollten an Patientenproben getestet werden und diese mit den Ergebnissen von gesunden Probanden verglichen werden. Ziel der Messung ist es, die Gesamtheit der Mikropartikel zu erfassen, als eine diagnostisch bisher nicht erfasste, pathophysiologisch interessante Größe.

Bei der Probengewinnung werden die Sepsisproben von Patienten der chirurgischen und internistischen Intensivstationen der Universität Rostock gewonnen. Um eventuelle tageszeitliche Schwankungen zu vermeiden, werden die Proben stets zur gleichen Uhrzeit abgenommen. Um durch lange Stauung übermäßigen Zellzerfall zu vermeiden, wird die Blutprobe ungestaut entnommen. Bei der Probengewinnung fallen die leichteren Formen der Sepsis heraus, die kein Organversagen haben und damit keiner Behandlung auf einer Intensivstation bedürfen. Das Krankheitsbild

"SEPSIS" stellt ein sehr heterogenes Krankheitsbild dar, welches in sämtlichen bisher untersuchten Eigenschaften stark variieren kann (61). Es sind sogar nichtinfektiöse Erkrankungen wie Trauma, Verbrennung, Pankreatitis oder Intoxikationen als Ursache möglich (57).

### **Messung der Patientenproben**

Die quantitative Messung der Bruchstücke in dem PKH2-GL-gestützten Assay zeigt bei den Sepsispatienten und bei den freiwilligen Kontrollprobanden einen signifikanten Unterschied mit  $p < 0,001$  nach Kruskal-Wallis. Drei Sepsisproben mit einem Keimnachweis von *E. coli* lagen mit ihren Messwerten innerhalb der übrigen Sepsismesswerte. Bei den hämolytischen Malariaproben geriet der Test an seine Grenzen, da durch Hämolyse getrübbtes Plasma die zu messende Fluoreszenz verfälscht, indem es sie abschwächt.

Eine erhöhte Anzahl an Mikropartikeln bei septischen Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden gilt heute als gesichert (1,29,55,64,67,72,74,101,120). Jansen et al. (45) konnten die Bruchstücke humaner Koronararterien-Endothelzellen nach Induktion einer Apoptose *in vitro* mittels Durchflusszytometrie nachweisen. Annexin I wird hier als einer der wesentlichen Rezeptoren zur Erkennung von Mikropartikeln beschrieben. Gleichzeitig wurden in diesen *in-vitro*-Versuchen elektronenmikroskopische Bilder der Mikropartikel angefertigt, um deren Größe zu bestimmen. Meziani et al. beschreibt eine Messung von Mikropartikeln bei septischen Patienten über immobilisiertes Annexin V, welches mit seiner hohen Affinität zu Phosphatidylserin an dieses und damit die Mikropartikel bindet (67). Für die Ermittlung der Zellherkunft der Mikropartikel hat sich die Durchflusszytometrie mit spezifischen Fluoreszenzantikörpern etabliert, und auch die Größe kann hierbei bestimmt werden, indem man Kalibrationspartikel einer bestimmten Größe einsetzt (47). Eine Stärke des Versuchsaufbaus der vorliegenden Arbeit besteht darin, dass alle Bruchstücke unabhängig von ihrer Herkunft quantitativ erfasst werden.

Die zuvor erwähnten diagnostischen Verfahren sind nicht standardisiert und damit kaum vergleichbar, da zum Beispiel unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe bei der Durchflusszytometrie verwendet oder die notwendigen Zentrifugationsschritte mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten oder Geräten durchgeführt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Anzahl von 51 verschiedenen Proben ist relativ klein, und damit ist die Gesamtaussagekraft beschränkt.

Störanfällig ist dieser Test bei Substanzen, die die Fluoreszenz von PKH2-GL verstärken oder abschwächen. Sind im Patientenplasma vermehrt Substanzen mit hoher Eigenfluoreszenz (z.B. Gallensäuren) vorhanden, wird die Fluoreszenz verstärkt. Stark vermindert wird die Fluoreszenz durch lipämisches oder hämolytisches Plasma, wie bei den Malariaproben. Selbst Fingerabdrücke an den Untersuchungsgefäßen beeinträchtigen die gemessene Intensität der Fluoreszenz. Auch die Eigenschaften der Untersuchungsgefäße, mattes oder glänzendes Material, beeinflussen die Messwerte erheblich und zeigen diesem Versuchsaufbau die Grenzen. Für die klinische Anwendung ist von Nachteil, dass die Inkubationszeiten und Waschschrte recht zeitaufwändig sind. Zur Versuchsoptimierung sind weitere Probemessungen notwendig, um belastbarere Daten zu erhalten. Hierbei sollte auch Anregungs- und Aussendungswellenlänge des Fluorometers auf das Optimum des PKH2-GL-Farbstoffes angepasst werden (Exzitation 490 nm, Emission 504 nm), um schärfer abgrenzbare Ergebnisse zu erhalten. Eine Altersnivellierung der beiden Vergleichsgruppen wäre dann ebenfalls erforderlich, da hier die gesunde Kontrollgruppe über 20 Jahre jünger ist. In der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich bei gesunden 65 jährigen keine höhere Partikelbelastung, so dass nicht von einer relevanten altersabhängigen Partikelzahl ausgegangen wird.

Der Testaufbau hat, mit o.g. Einschränkungen, sein Ziel, die Partikelmenge quantitativ zu messen, erfüllt und kann die Grundlage für therapeutische Überlegungen zur Partikelreduktion liefern. Er könnte neben den bereits etablierten Laborwerten, wie PCT, IL-6 und CRP, sowie den o.g. Scores ein ergänzender Test werden.

Eine Weiterentwicklung könnte als Voraussetzung für extrakorporale Therapien zur Partikelreduktion dienen, wie sie 2001 von Mitzner et al. beschrieben und von M. Sauer am Tiermodell erforscht wurden (49,68,92-94). Es kann auch ein Beitrag zur personalisierten oder individualisierten Sepsis-Therapie entstehen, wie sie von Abraham und Wheeler gefordert werden (2,115). Im Rahmen eines Multimarker-Panels wäre ein Einsatz der hier entwickelten Messtechnik denkbar, um eine bestimmte Subgruppe von Sepsiserkrankten zu identifizieren und sie dann ihrer spezifischen Therapie zuzuführen. In dieser personalisierten Therapie sollen nicht nur verschiedene Ursachen und Auslöser der Sepsis detektiert werden, sondern auch genetische Polymorphismen der Patienten und lokale Resistenzmuster der Erreger beachtet werden, die in allgemeinen Therapieempfehlungen bisher keine Beachtung finden (24).

Ob dieser Test auch für eine Risikoeinschätzung bezüglich der Prognose eines Überlebens geeignet ist, kann anhand der geringen Fallzahlen nicht abgeschätzt werden – wäre aber ein interessanter Parameter für weitere Untersuchungen.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Sepsis, die schwerste Verlaufsform einer akuten Infektion, zeigt trotz eines enormen finanziellen Aufwandes und weitgefächerter Forschungsaktivitäten nicht den erwünschten Abfall an Inzidenz und Mortalität. Neben den vielen diagnostischen und therapeutischen Ansatzpunkten, die entweder nur für einzelne Patientengruppen in Frage kommen oder gar keinen Effekt gezeigt haben, beobachtet man schon seit einiger Zeit Mikropartikel als eine interessante Größe bei diesem Krankheitsbild. Die genaue Bedeutung dieser Mikropartikel ist noch nicht endgültig geklärt, aber sie reicht von der Viskositätsveränderung des Blutes mit nachfolgenden Mikrothrombosen bis zu einer Gerinnungsaktivierung und zu einem Anstoß verschiedener Zytokinkaskaden mit nachfolgender Hyperinflammation, welche letztendlich zu einem Multiorganversagen führen und zu einer hohen Sepsisletalität beitragen.

Ziel dieser Arbeit war es, einen Assay zu entwickeln, der die Gesamtheit der Mikropartikel, unabhängig von ihrem Entstehungsort, quantitativ misst. In einem *in-vitro*-Modell wurden HL60-Zellen lysiert und die entstandenen Bruchstücke mittels eines fluoreszenzmarkierten Membranfarbstoffes gemessen. Darüber hinaus wurden Standardkurven erstellt. Nach Optimierung vieler Versuchsschritte wurden die Mikropartikelmengen von septischen Patienten gemessen und mit denen gesunder Kontrollprobanden verglichen.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, einen Test zum quantitativen Nachweis von Zellmembranbruchstücken zu entwickeln. Sowohl in den Vorversuchen als auch in klinischen Proben von Sepsispatienten konnte ein signifikanter Unterschied zu gesunden Probanden festgestellt werden. Diese Arbeit hat insbesondere eine Bedeutung für die Einteilung von Sepsispatienten in Subgruppen, die im Verlauf einer personalisierten Therapie zugeführt werden können. Bei der Subgruppe mit erhöhten Mikropartikeln könnten zum Beispiel extrakorporale Verfahren zur Verminderung von Mikropartikeln im Blutplasma zum Einsatz kommen.

## 6. Literaturverzeichnis:

1. Abrahams CS, Ellison N, Budzynsky AZ, Shattil SJ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood*, 1990;75:128.
2. Abraham E. New Definitions for Sepsis and Septic Shock: Continuing Evolution but With Much Still to Be Done. *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):757-9.
3. Altrichter J, Herstellungsanleitung der Firma Teraklin AG, Herstellung von all-trans Retinsäure, Warnemünde 2003.
4. Angus DC. The search for effective therapy for sepsis. Back to the drawing board? the journal of the American Medical Association. 2011 Dec 21;306(23):2614-5.
5. Annane D, Maxime V, Ibrahim F, Alvarez JC, Abe E, Boudou P. Diagnosis of adrenal insufficiency in severe sepsis and septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Dec 15;174(12):1319-26.
6. Beloborodova NV, Dmitrieva IB, Chervenskaia EA. Sepsis-induced immune paralysis: pathogenesis, diagnosis, and possible modes of correction. *Anesteziologiya i reanimatologiya*, 2008 Nov-Dec;(6):42-8.
7. Bernard AM, Bernard GR. The immune response: targets for the treatment of severe sepsis. *Int J Inflam*, 2012;Article ID 697592.
8. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001; 344(10):699-709.
9. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2007 Jan;81(1):1-5. Epub 2006 Oct 10.

10. Björkhem-Bergman L, Bergman P, Andersson J, Lindh JD. Statin treatment and mortality in bacterial infections - a systemic review and meta-analysis. *PloS one* 2010 May 19;5(5):e10702.
11. Blanc G. Na, K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. *Semin Nephrol.* 2005 Sep;25(5):292-303.
12. Bloos F, Thomas-Rüddel H, Rüddel H, Engel C, Schwarzkopf D, Marshall JC, Harbarth S, Simon P, Riessen R, Keh D, Dey K, Weiß M, Toussaint S, Schädler D, Weyland A, Ragaller M, Schwarzkopf K, Eiche J, Kuhnle G, Hoyer H, Hartog C, Kaisers U, Reinhart K; MEDUSA Study Group. Impact of compliance with infection management guidelines on outcome in patients with severe sepsis: a prospective observation multi-center study. *Crit Care.* 2014 Mar 3;18(2):R42.
13. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD 2nd, Kreisel D, Krupnick AS, Srivastava A, Swanson PE, Green JM, Hotchkiss RS. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 2011; 306:2594-2605.
14. Bouadma L, Luyt CE, Tubach F, Cracco C, Alvarez A, Schwebel C, Schortgen F, Lasocki S, Veber B, Dehoux M, Bernard M, Pasquet B, Régnier B, Brun-Buisson C, Chastre J, Wolff M; PRORATA trial group. Use of procalcitonin to reduce patients' exposure to antibiotics in intensive care units (PRORATA trial): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet.* 2010 Feb 6;375(9713):463-74.
15. Brunkhorst FM, Engel C, Bloos F, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weiler N, Moerer O, Gruendling M, Oppert M, Grond S, Olthoff D, Jaschinski U, John S, Rossaint R, Welte T, Schaefer M, Kern P, Kuhnt E, Kiehntopf M, Hartog C, Natanson C, Loeffler M, Reinhart K; German Competence Network Sepsis (SepNet). Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. *N Engl J Med.* 2008 Jan 10;358(2):125-139.
16. Brunkhorst FM, Reinhart K. Supportive und adjunktive Therapie der Sepsis. *Internist* 2009, Jul;50(7):817-24, 826-7.



17. Burger D, Erdbrügger U, Bruns KD. Re: Microparticles: markers and mediators of sepsis-induced microvascular dysfunction, immunosuppression, and AKI. *Kidney Int.* 2015 Oct;88(4):915.
18. Burgmann H. First-line anti-infective treatment in sepsis. *Med Klin Intensivmed Notfmed.* 2014 Nov;109(8):577-82.
19. Cabrera JL, Pinsky MR. Management of septic shock: a protocol-less approach. *Crit Care.* 2015 Jun 19;19:260.
20. Caironi P, Tognoni G, Masson S, Fumagalli R, Pesenti A, Romero M, Fanizza C, Caspani L, Faenza S, Grasselli G, Iapichino G, Antonelli M, Parrini V, Fiore G, Latini R, Gattinoni L; ALBIOS Study Investigators. Albumin replacement in patients with severe sepsis or septic shock. *NEJM* 2014; Apr 10;370(15):1412-21.
21. Cantaluppi V, Gatti S, Medica D, Figliolini F, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Biancone L, Tetta C, Camussi G. Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int.* 2012 Aug;82(4):412-27.
22. Cho SY, Choi JH. Biomarkers of Sepsis. *Infect Chemother.* 2014 Mar;46(1):1-12.
23. Christensen S, Thomsen RW, Johansen MB, Pedersen L, Jensen R, Larsen KM, Larsson A, Tønnesen E, Sørensen HT. Preadmission station use and one-year mortality among patients in intensive care-a cohort study. *Critical Care*, 2010;14(2):R29.
24. Clec'h C. Prognosis of sepsis: lesson for epidemiological studies. *Critical care medicine.* 2011 Jul;39(7):1833-4.
25. Cohen J. Non-antibiotic strategies for sepsis. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Apr;15(4):302-7.

26. Dalton RR, Krauss JS, Greer Falls D, Fuller GK. Granulocytic Fragments in Sepsis. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, vo., 31 no 4, 2001.
27. de Azevando JR, Torres OJ, Beraldi RA, Ribas CA, Malafaia O. Prognostic evaluation of severe sepsis and septic shock: procalcitonin clearance vs  $\Delta$  Sequential Organ Failure Assessment. *J Crit Care*. 2015 Feb;30(1):219.e9-12.
28. De Backer D, Orbegozo Cortes D, Donadello K, Vincent JL. Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and pathogenesis of shock. *Virulence*. 2014 Jan 1;5(1):73-9.
29. Delabranche X, Boisramé-Helms J, Asfar P, Berger A, Mootien Y, Lavigne T, Grunebaum L, Lanza F, Gachet C, Freyssinet JM, Toti F, Meziani F. Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med*. 2013 Oct;39(10):1695-703.
30. Deutschman CS. Therapy for sepsis: Einstein once said .... *Br J Anaesth*. 2013 Nov;111(5):693-5.
31. Dreger NM, Degener S, Ahmad-Nejad P, Wöbker G, Roth S. Urosepsis -Ursache, Diagnose und Therapie. *Dtsch Arztebl Int*. 2015 Dec 4;112(49):837-48.
32. EB. Schnelltest auf Blutvergiftung. *Deutsches Ärzteblatt*, Jg 109, Heft 11, 16. März 2012.
33. EB. Sepsis frühzeitig erkennen. *Deutsches Ärzteblatt*, Jg 111, Heft 12, 21. März 2014. B445.
34. Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2013 Jan-Feb;50(1):23-36.
35. Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Melot C, Vincent JL. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critical ill patients. *JAMA* 2001 Oct 10;286(14):1754-8.

36. Fleischmann C, Thomas-Rueddel DO, Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublein S, Dennler U, Reinhart K. Fallzahlen und Sterblichkeitsraten von Sepsis-Patienten im Krankenhaus. Deutsches Ärzteblatt, Jg 113, Heft 10, 11. März 2016, 159-166.
37. Forest A, Pautas E, Ray P, Bonnet D, Verny M, Amabile N, Boulanger C, Riou B, Tedgui A, Mallat Z, Boddaert J. Circulating microparticles and procoagulant activity in elderly patients. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2010 Apr;65(4):414-20.
38. Fresenius M, Heck M, Repetitorium Intensivmedizin, 3. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg 2008.
39. Guntupalli K, Dean N, Morris PE, Bandi V, Margolis B, Rivers E, Levy M, Lodato RF, Ismail PM, Reese A, Schaumberg JP, Malik R, Dellinger RP, TLF LF-0801 Investigator Group. A phase 2 randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of talactoferrin in patients with severe sepsis. Crit Care Med 2013;41:706-16.
40. Heinzl S. Sepsis und Septischer Schock. Was bringt eine Albuminsubstitution? Deutsches Ärzteblatt, Jg 111, Heft 15, 11. April 2014. B552.
41. Höflich C, Volk HD. Immunmodulation in der Sepsis. Chirurg. 2002 Nov;73(11):1100-4.
42. Hoffmann JN, Fertmann JM, Schick K, Mauer M, Wirsching KC, Vollmar B, Menger MD, Jauch KW. Failure of microcirculation: diagnosis and therapeutic consequences. Dtsch Med Wochenschr. 2006 Nov 3;131(44):2489-92.
43. Ibrahim I. It is time to label sepsis as a public health problem. Journal of critical care. 2008 Dec;23(4):452-3.
44. Jain S, Sinha S, Sharma SK, Samantaray JC, Aggrawal P, Vikram NK, Biswas A, Sood S, Goel M, Das M, Vishnubhatla S, Khan N. Procalcitonin as a prognostic marker for sepsis: a prospective observational study. BMC Res Notes. 2014 Jul 17;7:458.

45. Jansen F, Yang X, Hoyer FF, Paul K, Heiermann N, Becher MU, Abu Hussein N, Kebschull M, Bedorf J, Franklin BS, Latz E, Nickenig G, Werner N. Endothelial microparticle uptake in target cells is annexin I/phosphatidylserine receptor dependent and prevents apoptosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Aug;32(8):1925-35.
46. Jekarl DW, Kim JY, Lee S, Kim M, Kim Y, Han K, Woo SH, Lee WJ. Diagnosis and evaluation of severity of sepsis via the use of biomarkers and profiles of 13 cytokines: a multiplex analysis. *Clin Chem Lab Med.* 2015 Mar;53(4):575-81.
47. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biró E, Nieuwland R, Sturk A, Dignat-George F, Sabatier F, Camoin-Jau L, Sampol J, Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM, Nomura S, Shet AS, Key NS, Hebbel RP. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost.* 2004 Oct;2(10):1842-51.
48. Klein M. Der Sequential Organ failure Assessment Score - Wertigkeit der Einzelparameter zur Erkennung des Patienten Outcome und Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit durch Einbeziehung der Parameter Extravaskuläres Lungenwasser und Indozyaningrün-Plasmaverschwinderate. Med. Dissertation 2005, Universität Jena.
49. Kleinfeldt T, Optimierung der Differenzierung der Humanen Leukozytenzelllinie HL-60 zu immunkompetenten Zellen für den therapeutischen Einsatz in extrakorporalen Bioreaktoren, Inauguraldissertation, Rostock 2003.
50. Kreymann KG, de Heer G, Nierhaus A et al. Use of polyklonal immunglobulins as adjunctive therapy for sepsis or septic shock. *Crit Care Med* 2007; 35(12):2677-2685.
51. Laher I. Microparticles have macro effects in sepsis. *Critical care medicine* 2011 Jul;39(7):1842-3.

52. Lee YJ , Hostman LL, Janania J, ReyesY, Kelly RE, Ahn YS. Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias. *Thrombosis research*, 1996;72:295.
53. Lehmann C, Holtfreter B. About small particles and small numbers in sepsis research. *Crit Care Med* 2009 Jun;37(6):2131-2.
54. Levi M, de Jonge E, van der Poll T. New treatment strategies for disseminated intravascular coagulation based on current understanding of the pathophysiology. *Ann Med* 2004;36:41-49.
55. Levi M, van der Poll T. Endothelial injury in sepsis. *Intensive Care Med*. 2013 Oct;39(10):1839-42.
56. Lin MT, Albertson TE. Genomic polymorphisms in sepsis. *Crit Care Med*. 2004 Feb;32(2):569-79.
57. Lorenz J. Die Therapie der schweren Sepsis. *Pneumologie*. 2009 Apr;63(4):197-204.
58. Lv S, Han M, Yi R, Kwon S, Dai C, Wang R. Anti-TNF- $\alpha$  therapy for patients with sepsis: a systematic meta-analysis. *Int J Clin Pract*. 2014 Apr;68(4):520-8.
59. Ma AC, Kubes P, Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2008;6:415-20.
60. MacArthur RD, Miller M, Albertson T, Panacek E, Johnson D, Teoh L, Barchuk W. Adequacy of early empiric antibiotic Treatment and survival in severe sepsis: Experience from MONARCS trial. *Clinical Infectious Diseases*. 2004; 38:284-8.
61. Marshall JC. Sepsis: rethinking the approach to clinical research. *J Leukoc Biol* 2008. 83:471-482.
62. Marshall JC. Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends Mol Med*. 2014 Apr;20(4):195-203.

63. McCulloh R, Opal SM. Human rekombinant lactoferrin for sepsis: Too good to be true? Crit Care Med 2013;41:908-9.
64. Mastronardi ML, Mostefai HA, Meziani F, Martínez MC, Asfar P, Andriantsitohaina R. Circulating microparticles from septic shock patients exert differential tissue expression of enzymes related to inflammation and oxidative stress. Crit Care Med 2011 Jul;39(7):1739-48.
65. Meng W, Paunel-Görgülü A, Flohe S, Witte I, Schädel-Höpfner M, Windolf J, Lötgers TT, Deoxyribonuclease is a potential counter regulator of aberrant neutrophil extracellular traps formation after major trauma. Mediator of inflammation. 2012; 2012:149560. Epub 2012 Jan 23.
66. Meyer R. Septischer Schock. Der Prüfung nicht standgehalten. Deutsches Ärzteblatt, 2008; Heft 14; 635.
67. Meziani F, Delabranche X, Asfar P, Toti F. Bench-to-bedside review: Circulating microparticles - a new player in sepsis? Critical care. 2010;14(5):236. Epub 2010 Oct 20.
68. Mitzner SR, Freytag J, Sauer M, Kleinfeldt T, Altrichter J, Klöhr S, Koball S, Stange J, Ringel B, Nebe B, Schmidt H, Podbielski A, Noeldge-Schomburg G, Schmidt R. Use of human preconditioned phagocytes for extracorporeal immune support: introduction of a concept. Ther Apher. 2001 Oct;5(5):423-32.
69. Moerer O, Quintel M. Definition, Epidemiologie und ökonomische Aspekte der Sepsis beim Erwachsenen. Internist 2009;Jul;50(7):788, 790-4, 796-8.
70. Monneret G, Venet F. Monocyte HLA-DR in sepsis: shall we stop following the flow? Crit Care. 2014 Jan 6;18(1):102.
71. Morel O, Toti F, Morel N, Freyssinet J, Microparticles in endothelial cell and vascular homeostasis: are they really noxious? Haematologica 2009; 94(3), 313-317.

72. Mortaza S, Martinez MC, Baron-Menguy C, Burban M, de la Bourdonnaye M, Fizanne L, Pierrot M, Calès P, Henrion D, Andriantsitohaina R, Mercat A, Asfar P, Meziani F. Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. *Crit Care Med.* 2009 Jun;37(6):2045-50.
73. Mostefai HA, Meziani F, Mastronardi ML, Agouni A, Heymes C, Sargentini C, Asfar P, Martinez AC, Andriantsitohaina R. Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *Crit Care Med* 2008;Vol 178, 1148-1155.
74. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Böing AN, Romijn FPHTM, Westendorp RGJ, Hack CE, Sturk A; Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis, *Blood.* 2000;95:930-935.
75. Nomura S, Komiyama Y, Miyake T, Miyazaki Y, Kido H, Suzuki M, Kagawa H, Yanabu M, Takahashi H, Fukuhara S. Amyloid- $\beta$  protein precursor-rich platelet microparticles in thrombotic diseases, *Thrombosis and Haemostasis* 1994,72:519.
76. Nomura S, Shouzu A, Nishikawa M, Kokawa T, Yasunaga K. Significance of platelet-derived microparticles in uremia. *Nephron,* 1993;63;485.
77. Opal SM, Laterre PF, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira JP, Wittebole X, Dugernier T, Perrotin D, Tidswell M, Jauregui L, Krell K, Pacht J, Takahashi T, Peckelsen C, Cordasco E, Chang CS, Oeyen S, Aikawa N, Maruyama T, Schein R, Kalil AC, Van Nufflen M, Lynn M, Rossignol DP, Gogate J, Roberts MB, Wheeler JL, Vincent JL; ACCESS Study Group. Effect of eritoran an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA* 2013;309:1154-62.
78. Opal SM, van der Poll T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J Intern Med.* 2015 Mar;277(3):277-93.

79. Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rödel J, Menge K, Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. Crit Care. 2011 Jul 28;15(4):R183.
80. Peck G, Andrades M, Lorenzi R, da Costa M, Petronilho F, Fonseca Moreira JC, Dal-Pizzol F, Ritter C. Serum-induced macrophage activation is related to the severity of septic shock. Inflamm.Res. 2009;Vol 58;89-93.
81. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications, Blood Reviews, 2007,21, 175-171.
82. Prakash PS, Caldwell CC, Lentsch AB, Pritts TA, Robinson BR. Human microparticles generated during sepsis in patients with critical illness are neutrophil-derived and modulate the immune response. The journal of trauma and acute care surgery 2012 Aug;73(2):401-6; discussion 406-7.
83. Prkno A, Wacker C, Brunkhorst FM, Schlattmann P. Procalcitonin-guided therapy in intensive care unit patients with severe sepsis and septic shock--a systematic review and meta-analysis. Crit Care. 2013 Dec 11;17(6):R291.
84. Pupelis G, Drozdova N, Mukans M, Malbrain ML. Serum procalcitonin is a sensitive marker for septic shock and mortality in secondary peritonitis. Anaesthesiol Intensive Ther. 2014 Sep-Oct;46(4):262-73.
85. rBiopharm. Gute ELISA-Praxis, Handbuch. 2016 mit ständiger Aktualisierung. [http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/540/2015-08\\_Gute\\_ELISA\\_Praxis\\_Handbuch\\_DE\\_Web.pdf](http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/540/2015-08_Gute_ELISA_Praxis_Handbuch_DE_Web.pdf).
86. Redman CWG, Sargent IL. Circulating microparticles in normal Pregnancy and pre-eclampsia. Placenta. 2008 Mar;29 Suppl A:S73-7.
87. Reid VL, Webster NR, Role of microparticles in sepsis. British journal of anaesthesia, 2012, Oct. 109(4): 503-13, Epub 2012, Sep 4.



88. Reinhart K, Brunkhorst FM, Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis, Thieme Verlag, Februar 2010.
89. Rublee D, Opal SM, Schramm W, Keinecke HO, Knaub S. Quality of life effects of antithrombin III in sepsis survivors: results from the KyberSept trial. Crit Care 2002;6:349-356.
90. Sagy M, Al-Qaqaa Y, Kim P. Definitions and pathophysiology of Sepsis. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care. 2013 Nov-Dec;43(10):260-3.
91. Sankar V, Webster NR, Clinical application of sepsis biomarkers. J Anesth. 2013 Apr;27(2):269-83.
92. Sauer M. (2012): Extrakorporale und bioartifizielle Therapie der Sepsis/Zellbasierte Diagnostik von Hepatotoxizität. Medizinische Habilitationsschrift, Universität Rostock.
93. Sauer M, Altrichter J, Kreutzer HJ, Lögters T, Scholz M, Nöldge-Schomburg G, Schmidt R, Mitzner SR. Extracorporeal cell therapy with granulocytes in a pig model of Gram-positive sepsis. Crit Care Med. 2009 Vol.37, No.2;606-13.
94. Sauer M, Altrichter J, Mencke T, Kloehr S, Thomsen M, Kreutzer HJ, Nöldge-Schomburg G, Mitzner SR. Plasma separation by centrifugation and subsequent plasma filtration: impact on survival in a pig model of sepsis. Ther Apher Dial. 2012 Jun;16(3):205-12.
95. Schmidbauer W, Stuhr M, Veit C, Hölldobler G, Lampl L, Kerner T. Die Bedeutung der Sepsis für die Notfallmedizin. Der Notarzt 2-2015;95-101.
96. Schürholz T. Sepsis und Multiorganversagen - Therapeutische Möglichkeiten. Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 2015;50:132-139.

97. Schumacher T, Kelm M, Buhn C, Preik-Steinhoff H, Kerber S, Heintzen MP, Heydthausen M, Strauer BE. Evaluierung eines neuen Sepsis-Score für eine internistisches Patientenkollektiv. *Intensivmed* 1999;36:33-39.
98. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, Rubenfeld G, Kahn JM, Shankar-Hari M, Singer M, Deutschman CS, Escobar GJ, Angus DC. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):762-74.
99. Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, Angus DC, Rubenfeld GD, Singer M; Sepsis Definitions Task Force. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):775-87.
100. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):801-10.
101. Souza AC, Yuen PS, Star RA. Microparticles: markers and mediators of sepsis-induced microvascular dysfunction, immunosuppression, and AKI. *Kidney Int*. 2015 Jun;87(6):1100-8.
102. Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, Weiss YG, Benbenishty J, Kalenka A, Forst H, Laterre PF, Reinhart K, Cuthbertson BH, Payen D, Briegel J; CORTICUS Study Group. Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med*. 2008;358:111-124.
103. Sriskandan S, Altmann DM. The immunology of sepsis. *J Pathol*. 2008 Jan;214(2):211-23.

104. Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG. The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:19-48.
105. Tajiri T, Miura K, Masuda S, Ohike N, Kunimura T, Mitsuya T, Morohoshi T. Sudden death caused by fulminant bacterial infection: background and pathogenesis of Japanese adult cases. *InternMed.* 2008;47(17):1499-504.
106. Tian Y, Tao T, Zhu J, Zou Y, Wang J, Li J, Bo L, Deng X. Soluble tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand level as a predictor of severity of sepsis and the risk of mortality in septic patients. *PLoS One.* 2013 Dec 12;8(12):e82204.
107. Timár CL, Lorincz AM, Csépanyi-Kömi R, Vályi-Nagy A, Nagy G, Buzás El, Iványi Z, Kittel A, Powell DW, McLeish KR, Ligeti E. Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood.* 2013 Jan 17;121(3):510-8.
108. Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systemic review and meta-analysis. *Crit Care Med.* 2006 Jul;34(7):1996-2003.
109. van der Voort PH, von Zanten M, Bosman RJ, van Stijn I, Wester JP, van Raalte R, Oudemans-van Straaten HM, Zandstra DF. Testing a conceptual model on early opening of the microcirculation in severe sepsis and septic shock: A randomised, controlled pilot study. *Eur J Anaesthesiol.* 2015 Mar;32(3):189-98.
110. Vester H, Dargatz P, Huber-Wagner S, Biberthaler P, van Griensven M. HLA-DR expression on monocytes is decreased in polytraumatized patients. *Eur J Med Res.* 2015 Oct 16;20:84.
111. Ward PA, Bosmann M. A historical perspective on sepsis. *Am J Pathol.* Jul 2012; 181(1): 2–7.
112. Warkentin ET, Hayward CP, Boshkov LK, Santos AV, Sheppard JA, Bode AP, Kelton JG. Sera from patients with heparin- induced thrombocytopenia generate

- platelet microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 1994;84:3691.
113. Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I, Chalupa P, Atherstone A, Péntzes I, Kübler A, Knaub S, Keinecke HO, Heinrichs H, Schindel F, Juers M, Bone RC, Opal SM Caring for the critically ill patient. High dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *J Am Med Ass* 2001;286(15):1869-1878.
  114. Werdan K, Pilz G, Bujdoso O, Fraunberger P, Neeser G, Schmieder RE, Viell B, Marget W, Seewald M, Walger P, Stuttmann R, Speichermann N, Peckelsen C, Kurowski V, Osterhues HH, Verner L, Neumann R, Müller-Werdan U. Score-based immunoglobulin G therapy of patients with sepsis: the SBITS study. *CritCareMed* 2007; 35(12):2693-2701.
  115. Wheeler DS. Is the "golden age" of the "golden hour" in sepsis over? *Crit Care*. 2015 Dec 29;19:447.
  116. Wun T, Paglieroni T, Holland P, Prolonged circulation of activated platelets following plasmapheresis. *Journal of clinical apheresis* 1994;91:10.
  117. Wurfel MM, Gordon AC, Holden TD, Radella F, Strout J, Kajikawa O, Ruzinski JT, Rona G, Black RA, Stratton S, Jarvik GP, Hajjar AM, Nickerson DA, Rieder M, Sevransky J, Maloney JP, Moss M, Martin G, Shanholtz C, Garcia JG, Gao L, Brower R, Barnes KC, Walley KR, Russell JA, Martin TR. Toll-like receptor 1 polymorphisms affect innate immune responses and outcomes in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Oct 1;178(7):710-20.
  118. Yasuhara S, Asai A, Sahani ND, Martyn JA, Mitochondria, endoplasmatic reticulum, an alternative pathways of cell death in critical illness. *Crit Care Med* 2007, Sept;35:S488-95.
  119. Zafrani L, Ince C, Yuen PS. Microparticles during sepsis: target, canary or cure? *Intensive Care Med*. 2013 Oct;39(10):1854-6.

120. Zhang Y, Meng H, Ma R, He Z, Wu X, Cao M, Yao Z, Zhao L, Li T, Deng R, Dong Z, Tian Y, Bi Y, Kou J, Thatte HS, Zhou J, Shi J. Circulating microparticles, blood cells, and endothelium induce procoagulant activity in sepsis through phosphatidylserin exposure. Shock. 2016 Mar;45(3):299-307.
121. Zhang Z. Biomarkers, diagnosis and management of sepsis-induced acute kidney injury: a narrative review. Heart Lung Vessel. 2015;7(1):64-73. Review.

## 7. Anhang

### 7.2.1 d

	1 0,5% Blocker	2 0,5% Blocker	3 2% Blocker	4 2% Blocker
<b>A</b>	1. AK - Zellen - 2. AK - 3. AK +	1. AK - Zellen - 2. AK - 3. AK +	1. AK - Zellen - 2. AK - 3. AK +	1. AK - Zellen - 2. AK - 3. AK +
<b>B</b>	1. AK - Zellen - 2. AK - 3. AK +	1. AK - Zellen - 2. AK - 3. AK +	1. AK - Zellen - 2. AK - 3. AK +	1. AK - Zellen - 2. AK - 3. AK +
<b>C</b>	1. AK + Zellen - 2. AK + 3. AK +	1. AK + Zellen - 2. AK + 3. AK +	1. AK + Zellen - 2. AK + 3. AK +	1. AK + Zellen - 2. AK + 3. AK +
<b>D</b>	1. AK - Zellen + 2. AK + 3. AK +	1. AK - Zellen + 2. AK + 3. AK +	1. AK - Zellen + 2. AK + 3. AK +	1. AK - Zellen + 2. AK + 3. AK +

### 7.2.1 j

#### Material

1. Zellen: 0308004, unstimuliert,  $1,6 \times 10^6$ /ml, Vitalität: 94 %,  
Zellen: 0308004, ATRA-Zusatz,  $1,6 \times 10^6$ /ml, Vitalität: 97%,
2. Wasser für Injektionszwecke, Serumwerk Bernburg AG, Deutschland, 100 ml,
3. C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> Detergenz, Anatrace, Maumee, United Kingdom,
4. Sigma, Steinheim, Tween 20, Nr. P1379,
5. Life Technologies, Phos Buffered Saline 7,4 (PBS), steril, Nr. 70011-036,
6. Geräte: Schüttler, Mikroskop, Zentifuge, Neubauerzählkammer, Pipetten und  
Spitzen von unterschiedlicher Größe, Eppendorf und Bluecab-Gefäße,
7. Trypanblau.

#### Durchführung

Mit ATRA, all-trans Retinsäure (siehe unten) werden die Zellen zur Differenzierung gemäß Herstellungsanleitung der Firma Teraklin angeregt (3). Die eingesetzten Prüfsbstanzen zur Zellzerstörung sind: C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, ein Detergens, Tween und starke thermische Differenzen in kurzer Zeit.

ATRA ist eine natürlich vorkommende Substanz, die als Signalmolekül insbesondere in der Entwicklungsbiologie und bei der Differenzierung von Zellen und Geweben eine große Rolle spielt. Hier wird es zur Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen in Richtung Granulozyten genutzt (Alt).

Die Zellansätze werden je 30 Minuten mit C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, oder einem Tween-C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>-Gemisch zusammengegeben bzw. 3x eingefroren und wieder aufgetaut. Parallel werden undifferenzierte und differenzierte Zellansätze getestet.

#### 7.2.1 o

##### **Material und Geräte**

1. ca. 5 ml HL60 Zellen, ca.  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml, Medium mit 10% Kälberserum (FKS), 1% Glutamin und DMEM ohne Phenolrot,
2. Tween 20, Nr. P1379 Sigma, Steinheim,
3. Monoclonal Antibody to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase- $\alpha_1$ , Alexis, N<sup>o</sup>: 804-080-R80, (1.AK),
4. Abcam, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase Antikörper, Nr. ab353, (2. AK),
5. Ultraschallbad mit Gehörschutz,
6. Albumin aus Rinderblut (BSA), Merck, Darmstadt, N<sup>o</sup>: 12018,
7. Alexa-Fluor 488 goat-anti-mouse IgM, Invitrogen, Kat.Nr. A21042, 250µl,
8. Alexa-Fluor 488 goat-anti-chicken IgG, Invitrogen, Kat.Nr. A11039, 0,5ml.

##### **Durchführung**

Die HL60-Zellen werden zur Zerstörung 90, 180 und 300 Sekunden dem Ultraschallbad ausgesetzt. Diese verschiedenen Ansätze werden in das FACS-Gerät gegeben, um die Größe und die Menge der Bruchstücke zu messen.

#### 7.2.1 p

##### **Material**

wie 7.2.1 o

### **Durchführung:**

Es wird entsprechend des vorigen Versuches die Ansätze folgendermaßen angesetzt:

	Zellen	1. AK	2.AK		Anti 1. AK	Anti 2. AK
001	h 400µl					
002	h 400µl	200µl			200µl	
003	h 400µl		200µl			200µl
004	h 400µl				200µl	
005	h 400µl					200µl
006	z 400µl					
007	z 400µl	200µl			200µl	
008	z 400µl		200µl			200µl
009	z 400µl				200µl	
010	z 400µl					200µl

Legende: h = heile Zellen, z = lysierte Zellen, 1. AK = anti-Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase (Maus), 2. AK = anti Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase (Huhn), Anit 1.AK = sekundärer Anti-Maus-AK, Anti 2. AK = sekundärer Anti-Huhn.AK.

### **7.2.3 a**

#### **Material**

1. PBS-Puffer aus der Zentralapotheke, 500 ml, Ca und Mg frei,
2. Pipetten und sterile Spitzen verschiedener Größen,
3. destilliertes, steriles Wasser,
4. ca. 5 ml HL60-Zellen, 1x10<sup>6</sup> Zellen pro ml, ca. 95% Vitalität, Medium mit 10% Kälberserum (FKS), 1% Glutamin und DMEM ohne Phenolrot,
5. Mikroskop mit Vergrößerung bis 1000fach, Deckgläser, Objektträger, Rundröhrchen (2ml),
6. Trypanblau,
7. Albumin aus Rinderblut (BSA), Merck, Darmstadt, N<sup>o</sup>:12018,
8. Diluent A aus Cell Linker Kit (siehe 10) Sigma, Saint Louis, USA,
9. schwarze Mikrotiterplatte, TC, steril, Greiner Labortechnik Cellstar<sup>®</sup>,
10. PKH2-GL, Sigma, Saint Louis, USA, Green Fluorescent Cell Linker Kit,
11. Zentrifuge mit bis zu 15 000G, hier von Firma Beckmann,
12. Schüttler für Rundröhrchen und Mikrotiterplatten, Waage,
13. Fluorometer, Fluoroscanner<sup>®</sup>, Vaanta, Finnland, Kat.Nr. 1506450,  
Es erfolgt eine Exzitation bei 485 nm und die Emission bei 538 nm
14. je 2,5 ml Plasma von septischen Patienten
15. Plasmaproben von malariainfizierten Patienten, die bei -80°C eingefroren waren und zwischen 2002 und 2005 gewonnen worden waren, von PD Dr. med. Christoph Hemmer, Uni Rostock zur Verfügung gestellt.



### Durchführung

I. Zuerst erfolgt das Waschen der Zellen: 2,5 ml der Zellsuspension werden entnommen (vorher schütteln) und mit 2,5 ml PBS versetzt. Es erfolgt ein Zentrifugieren für 10 Min bei 1600 Umdrehungen pro Minute. Der Überstand wird abgesaugt  $\Rightarrow$  die Zellen bleiben als Pellet im Gefäß und werden erneut mit 2,5 ml PBS versetzt, um das Pellet zu lösen (Schüttler). Das gelöste Pellet wird anschließend jeweils nochmals 10 Min. bei 1600U/min zentrifugiert und der Überstand erneut abgesaugt. Es werden wieder 2,5ml PBS hinzugegeben und das Pellet mittels Schüttler gelöst. Es wird nochmals zentrifugiert (wie vorher), der Überstand abgesaugt, und es wird die erste Hälfte mit 5 ml PBS resuspendiert. Diese werden mit 5 ml destilliertem Wasser versetzt, so dass die Zellen zerplatzen.

Ia. Es wird Rinderalbumin (BSA) für Punkt VII angesetzt.

II. Es werden jeweils unterschiedliche Volumina in ein Rundröhrchen gegeben.

	A	B	C
1	■	■	■
2	●	●	●
3	○	○	○
4	■	■	■
5	□	□	□

- 0,5 ml lysierte Zellen (100%)
- 0,375 ml lysierte Zellen (75%)
- 0,25 ml lysierte Zellen (50%)
- 0,125 ml lysierte Zellen (25%)
- keine Zellen

III. Die Gefäße werden 30 Min bei 15 000 G zentrifugiert. Vorsichtig wird der Überstand abgesaugt, so dass nicht mehr als 25µl über dem Pellet bleiben. In jedes (auch in das 5., 10. und 15. Gefäß) werden nun jeweils 0,5 ml Diluent A gegeben.

IV. Ansetzen von 2,5 ml  $4 \times 10^{-6}$  molarer PKH2-Verdünnung mit Diluent A unmittelbar vor Gebrauch (die Lösung soll, wegen des Ethanols weniger als 1% Farbstoff enthalten) Hier kommen 15 µl auf 7,5 ml Diluent A.

V. Es erfolgt die Zugabe von jeweils 0,5 ml Farbstofflösung in die jeweiligen Gefäße (zuletzt in Gefäße 5, 10 und 15). Wichtig ist immer ein schnelles und gleichmäßiges mixen, da die Farbstoffreaktion praktisch sofort einsetzt. Am besten hält man während des gesamten Arbeitsschrittes das Versuchsgefäß auf den Schüttler.

VI. Inkubation für 4 Minuten bei Raumtemperatur.

VII. Als Stoppreagenz wird 1% BSA-Lösung (0,1 g auf 10 ml PBS-Puffer) verwendet und jeweils 0,5ml für 1 Minute in die Gefäße gegeben.

VIII. Es erfolgt eine Zentrifugation für 30 Min bei 15 000 G, der Überstand wird abgenommen und das Pellet wird wieder in 1ml PBS-Puffer gelöst (noch besser sind 2x 0,5ml, um das Pellet besser zu lösen) und in ein jeweils neues Gefäß gegeben. Dieser Waschvorgang wird dreimal durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift werden 0,5ml, die Ausgangsmenge an PBS-Puffer, hinzugegeben.

IX. Die Zellsuspensionen werden nochmals gut durchmischt und auf die schwarzen Platten verteilt. In jedes Well kommen 100µl.

X. Es erfolgt die Messung im Fluorometer. Die Anregungswellenlänge hat bei 490 nm ihr Maximum und die Aussendungswellenlänge bei 504 nm. Die Anregung und Messung erfolgt so dicht beim Maximum wie mit dem Gerät möglich. Die Wellenlängen waren bei unserem Gerät 485nm und 538nm (Emission).

### 7.2.3 b

#### **Material**

1. Pipetten und Spitzen verschiedener Größen,
2. PBS-Puffer,
3. micromer-Partikel der Firma Micromod, Rostock, Prod. Nr. 29-00-202,  
Durchmesser 2 µm, plain, weiß, konjugiert mit PKH2-GL,
4. schwarze-Mikrotiterplatte, TC, steril, Greiner Labortechnik Cellstar<sup>®</sup>,
5. Schüttler, Beckmann-Zentrifuge mit bis zu 15 000G,
6. Fluorometer, Fluoroscans Ascent<sup>®</sup>, Vaanta, Finnland, Kat.Nr. 1506450.

### Durchführung

Es soll eine Standardkurve für den Farbstoff PKH2-GL aufgestellt werden. Dazu wurden weiße Latexkügelchen mit einem Durchmesser von 2 µm mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH2-GL kovalent verbunden. Es werden verschiedene Konzentrationen hergestellt, um eine Standardkurve zu erhalten.

I. Es werden die micromer-Partikel (siehe Material 3) folgendermaßen verdünnt.

Mikromer 2µm Durchmesser 3µl auf 2 ml PBS-Puffer, um eine Gesamtkonzentration von ca.  $1 \times 10^6$  Teilchen pro ml zu erhalten.

II. Es werden jeweils unterschiedliche ml in die Rundröhrchen gegeben

- 1. Gefäß: 0,5 ml Suspension 1 (mit micromer 29-00-202)
- 2. Gefäß: 0,375 ml Suspension 1 (75%)
- 3. Gefäß: 0,25 ml Suspension 1 (50%)
- 4. Gefäß: 0,125 ml Suspension 1 (25%)
- 5. Gefäß: 0,063 ml Suspension 1 (12,5%)
- 6. Gefäß: 0,032 ml Suspension 1 (6,25%)
- 7. Gefäß: keine Suspension

III. Es erfolgt die Zugabe von jeweils soviel ml PBS-Puffer in die jeweiligen Gefäße, dass ein Gesamtvolumen von 1ml in jedem Gefäß entsteht.

IV. In jedes Well kommen 100µl.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	100	75	50	25	0	100	75	50	25	0
B	100	75	50	25	0	100	75	50	25	0
C	100	75	50	25	0	100	75	50	25	0
D	100	75	50	25	0	100	75	50	25	0

Die Zahl in dem jeweiligen Feld stellt die Menge in Prozent von der Ausgangskonzentration dar.

V. Es erfolgt die Messung im Fluorometer, wie 2.3.1

### 7.2.3 c

#### **Material**

1. PBS-Puffer aus der Zentralapotheke, 500 ml, Ca und Mg frei,
2. Pipetten und Spitzen verschiedener Größen,
3. Rundröhrchen (2ml),
4. Biseko<sup>®</sup>, 500 ml, Biotest Pharma GmbH, Dreileich, Deutschland
5. schwarze-Mikrotiterplatte, TC, steril, Polifiltronics<sup>®</sup>,
6. micromer-Partikel der Firma Micromod, Rostock, Prod. Nr. 29-00-202,  
Durchmesser 2 µm, plain, weiß, konjugiert mit PKH2-GL,
7. Schüttler, Zentrifugen (mit bis zu 15 000 G), Waage, Ultraschallbad,
8. Fluorometer, Fluoroscans Ascent<sup>®</sup>, Vaanta, Finnland, Kat.Nr. 1506450.

#### **Durchführung**

Nach erfolgreichen Standardkurven mit PKH2GL – konjugierten Latexkugeln in wässriger PBS-Pufferlösung soll nun die Standardkurve noch einmal in Biseko durchgeführt werden. Biseko (eine Serumproteinlösung) ähnelt in seinen Eigenschaften dem menschlichen Plasma.

I. Es werden 10µl konjugierte micromer-Partikel in 1 ml Biseko verdünnt. Davon werden je 0.5 ml in 1,5 ml Biseko verdünnt. Die Mengenangaben sind ausreichend für 4 Proben.

II. Die Gefäße werden 30 Min bei 15 000 G zentrifugiert. Vorsichtig wird der Überstand abgesaugt, so dass nicht mehr als 25µl über dem Pellet bleiben. Es erfolgt jeweils eine Resuspension in 0,5 ml PBS-Puffer. Für die vollständige Lösung des Pellets ist ggf. das Ultraschallwasserbad erforderlich.

III. Es werden jeweils 100µl in jedes zu messende Well gefüllt.

IV. Es erfolgt eine Messung im Fluorometer, wie in Versuch 2.3 a

### 7.3.1 Ergänzungen zu den jeweiligen Ergebnissen in Abschnitt 3.1

#### 7.3.1 b ELISA zum Nachweis von Zellbruchstücken unter Einsatz eines anderen AK gegen die $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase- $\alpha$ und mit HL60 Zellen:

Tab. 3: Zellbruchstücke in Abhängigkeit von der Extinktion in relativen Einheiten. Spalte 1-2 sind Parallelansätze mit den unterschiedlichen Zellbruchstückmengen. Spalte 5 und 6: Positiv- und Negativkontrollen (siehe Material und Methoden)

	1	2	3	4	5	6
keine Zellen	0,400	0,458	-	-	0,705	0,572
keine Zellen	0,401	0,764	-	-	1,076	0,791
100% vitale Zellen	0,352	0,401	-	-	-	1,405
75 % vitale Zellen	0,432	0,404	-	-	-	1,281
50% vitale Zellen	0,383	0,365	-	-	-	-
25% vitale Zellen	0,352	0,406	-	-	-	-
0% vitale Zellen	0,472	0,399	-	-	-	-
Zerst. Zellen ohne Annexin	0,387	0,338	-	-	-	-

#### 7.3.1 c Austestung verschiedener Blocker: Rinderalbumin (BSA), Ziegenserum und Ziegen-IgG

Tab. 4: Einfluss der Wahl des Blockers. Reihen A und B zeigen BSA als Blocker, C und D Ziegenserum und E und F Ziegen-IgG. Dargestellt ist der jeweilige Blocker in Abhängigkeit von der Extinktion.

	1	2	3	4
A	1,769	0,968	0,729	0,619
B	0,787	0,739	0,538	0,530
C	1,328	0,660	0,365	0,588
D	0,479	0,524	0,311	0,301
E	1,584	1,232	1,042	1,456
F	0,724	0,875	0,628	0,430

#### 7.3.1 d Überprüfung der unspezifischen Bindungen im ELISA durch einen Versuchsansatz mit und ohne Zellen und Tween als neuem Blocker

Tab. 5: Überprüfung der unspezifischen Bindungen im ELISA. Extinktion nach 35 Min in Abhängigkeit der unspezifische Bindungen untereinander, 1. AK = 1. Antikörper, ebenso 2. und 3. Antikörper, Z = Zellen.

Spalten 1 und 2 mit 0,5%iger Tween-Blockung sowie 3 und 4 mit 2%iger Blockung

	1 (0,5%)	2 (0,5%)	3 (2%)	4 (2%)		Kontrollen
3.AK	0,548	0,522	0,557	0,479		1,563
3.AK	0,484	0,509	0,485	0,529		0,236
1.,2.,3.AK,	1,271	1,183	1,111	1,262		
1.,2.,3.AK, Z	1,811	1,670	1,555	1,437		

### 7.3.1 e Überprüfung weiterer unspezifischer Bindungen zwischen dem 1. und 2. sowie dem 2. und 3. Antikörper

Tabelle 6: Überprüfung unspezifischer Bindungen zwischen 1. und 2. AK und 2. und 3. AK. Extinktion nach 30 Minuten in Abhängigkeit von den unspezifischen Bindungen der einzelnen Antikörper untereinander. Spalte A: gemessene Extinktion, 1. AK = 1. Antikörper, ebenso 2. und 3. Antikörper, Z = Zellen. Spaltenbedeutung: \* nur in PBS gewaschene Zellen, \*\* 3x gewaschene Zellen

	A	1. AK	Z	2. AK	3. AK
<b>1</b>	<b>0,21</b>	+	-	-	+
<b>2</b>	<b>1,04</b>	+	-	+	+
<b>3</b>	<b>0,21</b>	+	-	+	-
<b>4</b>	<b>0,21</b>	+	+	+	-
<b>5</b>	<b>2,34</b>	-	-	+	+
<b>6</b>	<b>0,21</b>	-	+	-	+
<b>7</b>	<b>0,21</b>	-	+	-	-
<b>8</b>	<b>0,21</b>	-	+	-	-
<b>9</b>	<b>1,63</b>	-	+	+	+
<b>10</b>	<b>0,20</b>	-	+	-	+
<b>11</b>	<b>0,20</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>12</b>	<b>1,88</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

### 7.3.1 f Austestung der verschiedenen Blockerkonzentrationen und Ermittlung der besten Inkubationszeit

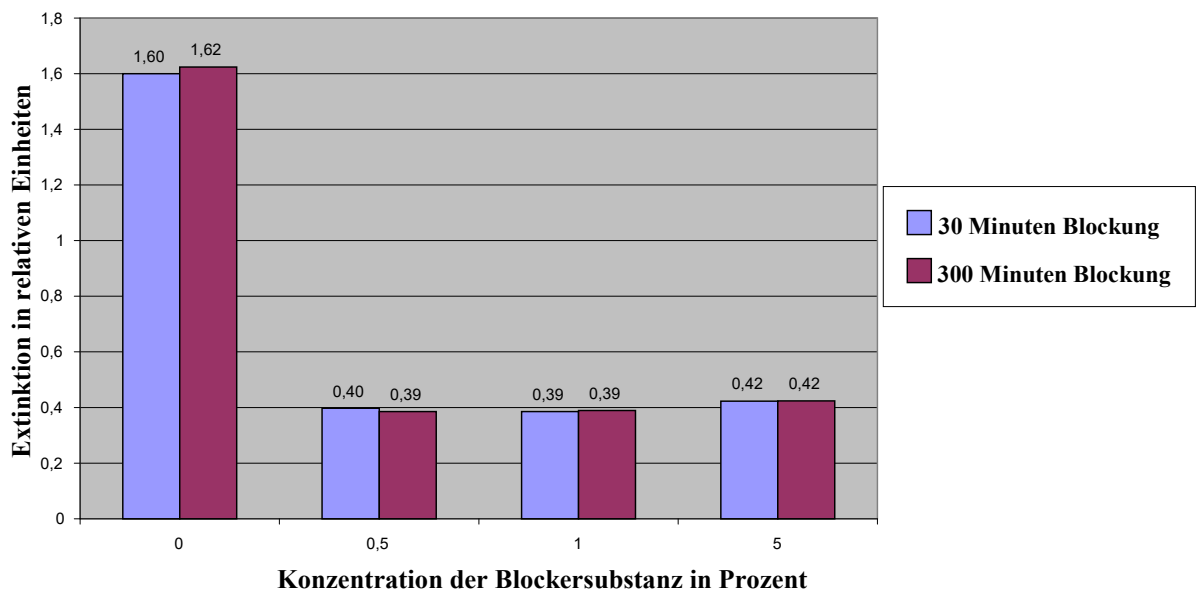


Abb. 23 Abhängigkeit der Extinktion von der Blockerkonzentration bzw. Blockzeit.

### 7.3.1 g ELISA mit optimierten Konzentrationen, Blockern und Inkubationszeiten:

Tabelle 7: Extinktion nach 30 Minuten in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration und der Menge der Zellbruchstücke. Spalte 1 bis 4 mit 0,1% BSA, Spalte 5 und 6 mit 0,5%igem BSA. Von A nach C nimmt jeweils die Zellzahl ab. Und zwar: Reihe A 1:1, Reihe B 1: 10, Reihe C 1:100.

	0,1% BSA	0,1% BSA	0,1% BSA	0,1% BSA	0,5% BSA	0,5% BSA
A	1,472	1,765	1,668	1,691	2,108	2,076
B	1,287	1,493	1,300	1,335	1,424	1,404
C	1,237	1,269	1,221	1,102	0,449	0,438

### 7.3.1 i Optimierter ELISA nach vorherigem Waschen der Zellen

Tabelle 8: Extinktionen des optimierten ELISA nach vorherigem Waschen der Zellen. In den Wells A1 bis A4 sowie A7 und A8 wurden unverdünnte Zellen gegeben. In den Reihen B und C wurden eine 1:10 bzw. 1:100-Verdünnung erstellt. In den Wells A5 und A6 ist unverdünntes Zellmedium. Der erste AK ist nur in A1 bis C4. Die Zellen in Spalte 3 und 4 wurden nicht gewaschen

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1,238	1,250	2,209	2,048	2,865	2,865	0,312	0,310
B	1,633	1,545	2,368	2,312	---	---	0,400	0,400
C	1,777	1,709	1,950	1,945	---	---	0,496	0,465

### 7.3.1 k Ermittlung der Resistenz der HL60-Zellen gegen Ultraschall im Wasserbad nach unterschiedlichen Inkubationszeiten

Ohne US – Behandlung	:	$6,65 \times 10^5$ Zellen/ml
Nach 5 sek US	:	$5,8 \times 10^5$ Zellen/ml
Nach 10 sek US	:	$3,5 \times 10^5$ Zellen/ml
Nach 20 sek US	:	$0,875 \times 10^5$ Zellen/ml

### 7.3.1 l optimierter ELISA

Tabelle 9: Extinktionen des optimierten ELISA - 1. Versuchsansatz. Extinktion nach 30 Minuten in Abhängigkeit von der Zahl der Membranbruchstücke. In Spalte 1 sind 100% unlysierte Zellen, Spalte 2 sind 25% lysierte Zellen und 75% unlysierte Zellen. In Spalte 3 sind 50% lysierte und unlysierte Zellen, in Spalte 4 75% lysierte Zellen und in Spalte 5 100% unlysierte Zellen. A12 ist ohne Zellen, B12 ohne 1. AK, C12 ohne 2. AK, C12 ohne jeglichen AK. A11 ist die Positivkontrolle und B11 die Negativkontrolle.

	1	2	3	4	5	-	11	12
A	0,035	0,036	0,035	0,036	0,037		1,121	0,039
B	0,035	0,038	0,037	0,037	0,037		0,036	0,040
C	0,037	0,037	0,037	0,040	0,041			0,040
D	0,040	0,039	0,038	0,041	0,040			0,040

### 7.3.1 m optimierter ELISA

Tabelle 10: Extinktionen des optimierten ELISA - 2. Versuchsansatz. Extinktion nach 30 Minuten in Abhängigkeit von der Zahl der Membranbruchstücke. In Spalte 1 sind 100% unlysierte Zellen, Spalte 2 sind 25% lysierte Zellen und 75% unlysierte Zellen. In Spalte 3 sind 50% lysierte und unlysierte Zellen, in Spalte 4 75% lysierte Zellen und in Spalte 5 100% unlysierte Zellen. A12 ist ohne Zellen, B12 ohne 1. AK, C12 ohne 2. AK, C12 ohne jeglichen AK. A11 ist die Positivkontrolle und B11 die Negativkontrolle.

	1	2	3	4	5	-	11	12
A	0,040	0,040	0,037	0,040	0,042		overfl.	0,037
B	0,039	0,038	0,037	0,039	0,041		0,050	0,041
C	0,039	0,038	0,039	0,038	0,037			0,039
D	0,040	0,041	0,040	0,039	0,039			0,034

Eine Korrelation zwischen dem Anteil toter Zellen und der Extinktion ist in den beiden vorgenannten Versuchen **nicht** gegeben.

### 7.3.1 n optimierter ELISA

Tabelle 11: Extinktionen des optimierten ELISA - mit gewaschenen Zellen. Extinktion nach 30 Min. in Abhängigkeit von der Menge der Zellbruchstücke (Ansteigend von Spalte 1 bis 5. In Spalte 1 sind 100% unlysierte Zellen, Spalte 2 sind 25% lysierte Zellen und 75% unlysierte Zellen. In Spalte 3 sind 50% lysierte und unlysierte Zellen, in Spalte 4 75% lysierte Zellen und in Spalte 5 100% unlysierte Zellen. A12 und B12 sind ohne Zellen, hier soll Bindung von 2. und 3. AK getestet werden. A11 ist die Positivkontrolle und B11 die Negativkontrolle.

	1	2	3	4	5	-	11	12
A	0,316	0,259	0,244	0,234	0,254		0,876	0,161
B	0,268	0,253	0,273	0,241	0,225		0,127	0,200
C	0,268	0,258	0,264	0,250	0,228			
D	0,269	0,261	0,356	0,260	0,261			

Eine Korrelation (**Spearman-Rho**) zwischen dem Anteil toter Zellen und der Extinktion ist in den drei vorgenannten Versuchen **nicht** gegeben.



## 7.3.2 Fluoreszenzfarbstoff-Konzept

### 7.3.2 a Modifikation des Assays nach 2.1 durch Einführung des Farbstoffes PKH2-GL anstelle des 2. Antikörpers

Tabelle 12: Vorversuch mit dem Farbstoff PKH2-GL. Fluoreszenz nach 30 Minuten. In den Spalten sind jeweils 3 Parallelansätze. In Spalte 1 sind unlysierte und in Spalte 2 lysierte Zellen mit jeweils 1. AK und Fluoreszenzfarbstoff. In Spalte 3 sind Zellen ohne AK und Fluoreszenzfarbstoff (Flf.), in Spalte 4 nur der Flf. und in Spalte 5 der 1. AK und Flf ohne Zellen.

	Vitale Zellen	Lysierte Zellen	Zellen ohne AK	Nur Flf. ohne Zellen	1. AK und Flf. ohne Zellen
A	6,967	8,707	0,045	11,725	0,643
B	7,015	8,537	0,050	11,435	0,730
C	5,151	8,486	0,043	10,322	0,777

### 7.3.2 b Optimierung des PKH2-GL-Assays mit reduzierter Zellzahl

Tabelle 13: Fluoreszenzfarbstoff bei reduzierter Zellzahl. Fluoreszenz nach 30 Minuten, dargestellt sind 3 Parallelansätze in Zeilen A bis C.

	Vitale Zellen	Lysierte Zellen	Zellen ohne AK	Nur 2. AK ohne Zellen	1. und 2. Ak ohne Zellen
A	8,470	10,310	0,047	9,452	8,697
B	8,611	10,829	0,050	10,660	8,634
C	10,215	10,413	0,053	10,535	9,820

Tabelle 14: Weitere Messungen mit reduzierter Zellzahl. Fluoreszenz nach 30 Minuten, dargestellt sind 3 Parallelansätze in Zeilen A bis C.

	Vitale Zellen	Lysierte Zellen	Zellen ohne AK	Nur 2. AK ohne Zellen	1. u. 2. Ak ohne Zellen
A	9,3611	8,2475	0,0503	7,7987	7,7067
B	8,0734	8,1702	0,0481	10,0559	7,9731
C	8,8696	7,6433	0,0489	8,2042	8,4284

### 7.3.2 c Austausch von Rinderalbumin als Blocker gegen Tween 20

Tabelle 15: Tween als neuer Blocker. Fluoreszenz nach 30 Minuten, dargestellt sind 3 Parallelansätze in Zeilen A bis C.

	Vitale Zellen	Lysierte Zellen	Zellen ohne AK	Nur 2. AK ohne Zellen	1. u. 2. Ak ohne Zellen
A	7,3799	6,6847	0,0491	8,3325	9,1066
B	7,2784	7,1893	0,0495	9,3035	9,4184
C	6,8142	6,7989	0,0492	8,4246	7,5440

### 7.3.2 e Optimierung des Tests ohne Notwendigkeit einer Blockung von unerwünschten Bindungen. Zwei unterschiedliche Platten werden parallel getestet.

Tabelle 16: Testung der matte Mikrotiterplatte von Greiner. Dargestellt sind 4 Parallelansätze in Zeilen A bis D.

	vitale Zellen	Zerst. Zellen	Keine Zellen	50% vitale Zel.	50%zerst. Zel.
A	1,8707	0,0764	0,0919	1,2162	0,0828
B	2,0172	0,0794	0,0968	1,1169	0,0890
C	2,1314	0,0893	0,0914	1,0456	0,0795
D	2,1037	0,0980	0,1211	1,0296	0,0784

Tabelle 17: Testung der glänzenden, glatte Mikrotiterplatte von Greiner. Dargestellt sind 4 Parallelansätze in den Zeilen A bis D.

	vitale Zellen	Zerst. Zellen	Keine Zellen	50% vitale Zel.	50%zerst. Zel.
A	2,2099	0,0691	0,1141	1,2732	0,0828
B	2,0199	0,1048	0,0908	1,1127	0,1101
C	2,0202	0,0646	0,0951	1,2497	0,0714
D	1,9978	0,0690	0,0793	1,4257	0,0670

### 7.3.2 f Optimierung des Tests ohne Notwendigkeit einer Blockung mit höherer G-Zahl beim Zentrifugieren

Tabelle 18: Erhöhung der G-Zahl beim Zentrifugieren. Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Bruchstückmenge. Dargestellt sind 4 Parallelansätze in den Reihen A bis D.

	vitale Zellen	lysierte Zellen	Keine Zellen	50% vitale Zellen	50% lysierte Zellen
A	7,0040	0,0682	0,0699	1,3945	0,0724
B	6,6137	0,0684	0,0924	1,4099	0,0719
C	6,7662	0,0665	0,0676	1,5491	0,0509
D	6,8583	0,0617	0,0639	1,5397	0,0957

### 7.3.2 g Änderung in der Abfolge der Versuchsschritte: Es wird zuerst gefärbt und anschließend werden die HL60-Zellen lysiert.

Tabelle 19: Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Bruchstückmenge bzw. der Zerstörungszeit mit Ultraschall (US). Dargestellt sind 4 Parallelansätze in den Reihen A bis D.

	vitale Zellen	360 Sek. US	180 Sek US	30 Sek US	Keine Zellen
A	3,0167	1,7785	1,3855	1,7895	0,0736
B	3,5123	17653	1,3927	1,7419	0,0642
C	2,9289	1,7773	1,3338	1,7447	0,0620
D	2,7940	1,7472	1,3207	1,6918	0,0583

### 7.3.2 i Optimierung des Ansatzes mit in destilliertem Wasser lysierten Zellen

Tabelle 20: Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zellbruchstückmenge. Dargestellt sind 4 Parallelansätze in den Reihen A bis D.

	vitale Zellen	lysierte Zellen	50% vitale Zellen	Keine Zellen	50% lysierte Zellen
A	6,1998	0,1249	1,9334	0,0652	0,0936
B	5,9817	0,1363	1,8136	0,0593	0,0785
C	5,6417	0,1350	2,3955	0,0575	0,0865
D	5,6317	0,1349	2,1797	0,0607	0,0811

### 7.3.2 j Weitere Testoptimierung, wie unter 2.2 i

Tabelle 21: Weitere Messungen der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zellbruchstückmenge. Dargestellt sind 4 Parallelansätze in den Reihen A bis D.

	vitale Zellen	lysierte Zellen	keine Zellen	50% vitale Zellen	50% lysierte Zellen
A	14,1129	3,5738	0,0897	11,3043	1,5102
B	14,0907	3,5376	0,2591	12,0850	1,5225
C	14,7728	3,6469	0,0948	11,3291	1,5260
D	14,6602	3,7808	0,0799	10,6175	1,4739

#### 7.3.2.1 Weitere Optimierung der Drehzahl beim Zentrifugieren, um möglichst viele kleine Bruchstücke zu erhalten

Tabelle 22: Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Bruchstückmenge und unterschiedlichen G-Zahlen bei der Zentrifugation. In den Reihen A bis D sind Parallelansätze mit einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 13000 U/Min und E bis H 26000 U/Min.

	vitale Zellen	100% lysierte Zellen	75% lysierte Zellen	50% lysierte Zellen	25% lysierte Zellen	keine Zellen
A	9,6971	2,0603	1,3227	0,3639	0,2846	0,0864
B	9,8748	2,1416	1,3804	0,3647	0,2962	0,0892
C	8,8754	2,2087	1,6442	0,3961	0,2837	0,1882
D	9,2347	2,3144	1,3328	0,6106*	0,3021	0,1218
E	5,1039	12,6970	6,6756	1,9445	0,4109	0,0994
F	4,8292	11,7675	6,1355	1,5041	0,3935	0,0976
G	6,4614	9,7199	6,5068	1,8883	0,4300	0,1078
H	4,9170	7,9972	6,9541	3,5520*	0,4355	0,1059

Tabelle 23: Ermittlung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Bruchstückmenge und unterschiedlichen G-Zahlen bei der Zentrifugation. In den Reihen A bis D sind Parallelansätze mit einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 13000 U/Min und E bis H 26000 U/Min

	Vitale Zellen	100% lysierte Zellen	75% lysierte Zellen	50% lysierte Zellen	25% lysierte Zellen	keine Zellen
A	4,6529	4,8885	1,3775	1,1811	0,9011	0,0819
B	5,2394	4,5457	1,4170	0,9812	0,8705	0,0726
C	4,8152	4,6761	1,4109	1,0149	0,8995	0,0730
D	4,8596	4,7952	1,5113	1,0922	0,8984	0,0701
E	4,8844	24,3131	16,9501	8,1955	0,3578	0,2195
F	4,9421	22,4678	12,9483	5,3761	0,4078	0,1371
G	4,2180	20,4678	35,5223	6,4097	0,3845	0,1210
H	5,7682	28,2659	18,0506	5,9684	0,3912	0,1280

### 7.3.2 m Erstellung der Standardreihe mit lysierten HL-60 Zellen

Tabelle 24: Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Bruchstückmenge und unterschiedlichen G-Zahlen bei der Zentrifugation. Reihe A bis D werden mit 13000 U/Min zentrifugiert und Reihe E bis H mit 20000 U/Min.

	Vitale Zellen	100% lys. Zellen	75% lys. Zellen	50% lys. Zellen	25% lys. Zellen	keine Zellen
A	4,9849	0,3867	0,3848	0,5874	0,3087	0,0841
B	4,9460	0,3504	0,3842	0,4864	0,5517	0,0764
C	4,7893	0,3422	0,9594	0,6008	0,3030	0,0796
D	4,6721	0,3690	0,3718	0,6514	0,3378	0,0752
E	4,6874	0,7953	0,4261	0,2760	0,1678	0,1098
F	4,4592	0,7324	0,4348	0,2814	0,1601	0,0840
G	4,5015	0,7630	0,4342	0,2532	0,1776	0,0864
H	4,5714	0,8240	0,4409	0,2336	0,1604	0,0853

Tabelle 25: Weitere Ermittlungen der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Bruchstückmenge mit zwei verschiedenen Zentrifugationsgeschwindigkeiten Reihe A bis D werden mit 13000 U/Min zentrifugiert und Reihe E bis H mit 20000 U/Min

	Vitale Zellen	100% zerst. Zellen	75% zerst. Zellen	50% zerst. Zellen	25% zerst. Zellen	keine Zellen
A	2,5421	0,7921	0,8101	0,6181	0,5281	0,3981
B	2,5171	0,7541	0,7231	0,5841	0,4611	0,0921
C	2,6711	0,6391	0,9481	0,7861	0,4381	0,0731
D	2,4361	0,7121	0,9631	2,3361	0,5211	0,0721
E	4,6841	0,9321	zerbrochen	0,4511	0,2571	0,0961
F	4,5261	1,0111	zerbrochen	0,4681	0,2761	0,0971
G	4,2861	1,1391	zerbrochen	0,9121	0,3591	0,0751
H	4,3361	1,1521	zerbrochen	0,7031	0,9791	0,1441

### 7.3.2 n Erstellung der Standardreihe mit lysierten HL-60 Zellen

Tabelle 26: Fluoreszenz der lysierten HL-60 Zellen in Abhängigkeit von der Bruchstückmenge. Dargestellt sind 3 Parallelansätze mit je 4 Messungen unter identischen Bedingungen an unterschiedlichen Versuchstagen in Reihen A bis D, Reihen E bis H und I bis L. Das Well J2 wurde stark verunreinigt und ergab damit keine verwertbare Messung.

	vitale Zellen	100% lys. Zellen	75% lys. Zellen	50% lys. Zellen	25% lys. Zellen	keine Zellen
A	14,9328	7,7433	8,7031	1,9610	0,4943	0,0750
B	15,8560	7,9820	6,7891	2,2058	0,5790	0,0944
C	16,4956	9,0410	3,8084	2,4280	0,6617	0,0838
D	15,0409	7,0518	4,2308	2,7168	0,7775	0,0703
E	24,8716	8,8022	2,3865	0,7985	0,3496	0,2622
F	24,7919	12,2394	2,7324	0,8081	0,3557	0,1865
G	24,0582	9,5337	2,4025	1,1212	0,3895	0,2004
H	24,4693	12,7215	2,8261	1,4863	0,4783	0,2714
I	9,7137	7,1469	8,2597	0,7262	0,1621	0,0702
J	10,0860	---	9,6023	0,7025	0,1307	0,1275
K	9,9198	7,2590	8,0338	0,9388	0,2952	0,0732
L	9,5894	6,7538	9,3455	0,9419	0,2453	0,3747



## **Danksagung**

Bedanken möchte ich mich für die Vergabe des Themas und allgegenwärtige Förderung meines Anliegens durch kritische und hilfreiche Anregungen bei Prof. Dr. Mitzner und Dr. Altrichter.

Allen Mitarbeiterinnen der Forschungsdialyse, insbesondere Frau Weiss-Reining und Frau Potschka gebührt mein Dank für die Mühen bei der organisatorischen, logistischen und technischen Unterstützung.

Allen, auch nicht namentlich genannten Förderern dieser Dissertation möchte ich meinen Dank aussprechen.

Rostock, 14. Dezember 2016





Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin  
Sektion Nephrologie  
Leiter: Prof. Dr. med. S. Mitzner

## **Thesen**

zur

### **Inauguraldissertation**

Entwicklung eines diagnostischen Parameters zur Bestimmung der Belastung des  
Patientenplasmas mit phagozytosepflichtigem Material

zur Erlangung des akademischen Grades

### **Doktor der Medizin**

der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von:

**Hartmut Duppel, Rostock**

Rostock, 2016

## Thesen:

1. Sepsis ist eine Erkrankung mit einer hohen Mortalität und Letalität, die in den letzten Jahren unverändert hoch geblieben ist.
2. Bei der Sepsis kommt es zu einem als Immunparalyse bezeichneten Zustand, in dem die zelluläre Abwehrfunktion und Phagozytosefähigkeit ausfallen oder versagen.
3. Ein diagnostischer Parameter zur Einschätzung der Schwere der Immunparalyse existiert bislang nur eingeschränkt. Mit dem Alarmin HMGB1 kann lediglich die Phagozytoseaktivität der Monozyten abgeschätzt werden, aber nicht die Belastung des Plasmas mit phagozytosepflichtigem Material gemessen werden.
4. Mikropartikel von verschiedenen Ursprungsarten wurden bereits seit längerem beschrieben, konnten aber bislang nicht in ihrer Gesamtheit erfasst werden.
5. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst versucht, einen ELISA-basierten Test zu entwickeln, was aufgrund vielfältiger unspezifischer Bindungen nicht zum Erfolg führte. Auch der hohe zeitliche Aufwand für ein einzelnes Messergebnis sprachen gegen den effizienten Einsatz dieses Verfahrens.
6. Es konnte ein fluoreszenzfarbstoffbasierter Test entwickelt werden, mit dem es möglich ist, die Gesamtheit der Mikropartikel im Plasma quantitativ zu bestimmen.
7. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurden in-vitro-Standardkurven erstellt und anschließend die Mikropartikelbelastung von Patientenplasmen und gesunden Probanden bestimmt.
8. Diese Bestimmung hat eine Bedeutung für die Einteilung der Sepsispatienten in Subgruppen. Bei der Subgruppe mit erhöhten Mikropartikeln könnten therapeutische Verfahren zur Verminderung von Mikropartikeln im Blutplasma zum Einsatz kommen.